



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2004

**Célia Laurinda dos
Santos Nogueira**

**Vírus Epstein-Barr (EBV) e o Carcinoma Gástrico:
Frequência da associação com o EBV e
quantificação do DNA viral nos tumores**



**Célia Laurinda dos
Santos Nogueira**

**Vírus Epstein-Barr (EBV) e o Carcinoma Gástrico:
Frequência da associação com o EBV e
quantificação do DNA viral nos tumores**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Augusto Cezar de Magalhães Sant'Ana, Professor associado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

o júri

presidente

Prof. Dr. Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Augusto Cezar de Magalhães Sant'Ana
professor associado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Prof. Dra. Maria Wanda Fernandes de Freitas Canas Ferreira
professora catedrática do Instituto de Higiene e Medicina Tropical

agradecimentos

As primeiras linhas são naturalmente dedicadas ao Professor Doutor Augusto Cezar de Magalhães Sant’Ana pela sua douda orientação, pelo seu incessante apoio e por todas as facilidades concedidas que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Desejo manifestar um agradecimento especial ao Professor Doutor Maximino Leitão por toda a ajuda e sugestões, sem as quais o resultado final teria, com toda a certeza, ficado muito aquém do conseguido.

Ao Professor Doutor Fernando Regateiro, quero expressar a minha gratidão pela utilização de meios e de equipamentos no Centro de Histocompatibilidade do Centro, o que muito contribuiu para aumentar os meus conhecimentos.

Manifesto o meu grande apreço e profundo reconhecimento à Dra. Gina Marrão pelo incansável apoio, pelos importantes ensinamentos e por desde o primeiro instante estar sempre ao meu lado, brindando-me com a sua amizade.

Agradeço de forma reconhecida ao Dr. Paulo Figueiredo por toda a ajuda e permanente disponibilidade que sempre manifestou e que muito contribuíram para a concretização deste estudo.

A todos os que cooperaram directamente para que este trabalho fosse possível. Ao Dr. João Ganho, à Dra. Manuela Lacerda, ao Dr. Fernando Martinho, ao Prof. Doutor António Patrício, à Dra. Teresa Lindo, ao Dr. Carlos Gregório, ao Dr. Miguel Areia, à Dra. Helena Vasconcelos, à Dra. Maria Irene Martins e seus colaboradores expresso o meu reconhecimento pela colaboração prestada na selecção e recolha das amostras.

Ao Dr. Artur Paiva o meu obrigado por toda a ajuda disponibilizada na execução das técnicas de citometria de fluxo e também, pelas conselhos críticos que valorizaram em muito este trabalho.

Agradeço à Dra. Fátima Garção a assistência prestada no desempenho da técnica de ELISA.

O meu agradecimento ao Dr. Paulo Santos pela colaboração dada na realização da técnica de PCR em tempo real.

Agradeço à Dra. Graça Rocha pelo apoio e todo o interesse que sempre manifestou pelo meu trabalho.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia por todo o carinho e ajuda prestada ao longo deste percurso, o meu muito obrigado.

Agradeço à Dra. Ana Domingos todo o apoio e ajuda no tratamento estatístico deste trabalho.

Ao Ricardo quero agradecer as palavras de incentivo, a estima e o empenhado contributo na execução gráfica desta dissertação.

A meus pais, o meu mais sentido reconhecimento por todo o carinho e apoio dado, que contribuíram, de uma forma ímpar, para a minha formação pessoal e académica.

À minha família e a minha amiga Helena o meu obrigado pelo desvelo com que me apoiaram ao longo desta caminhada.

resumo

O vírus Epstein-Barr (EBV), membro da família *Herpesviridae* é um dos herpesvírus mais frequentes. É um vírus ubiquitário e grande parte da população é infectada por ele. É o agente da mononucleose infecciosa e a ele estão associados vários carcinomas humanos. Recentemente, foi demonstrado a sua associação a carcinomas gástricos. Por outro lado, é importante salientar que os indivíduos portadores destes carcinomas possuem títulos elevados de anticorpos específicos para o EBV, demonstrando que ele poderá estar implicado na progressão tumoral.

Neste trabalho, foram estudados 39 indivíduos com carcinoma gástrico (CG). A pesquisa do DNA do EBV foi efectuada pela reacção de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real em amostras de soro sanguíneo, de saliva, de biopsias gástricas tumorais e normais. Com o objectivo de traçar o perfil serológico foram pesquisados pela técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) os seguintes anticorpos específicos para o EBV: VCA IgM, EBNA IgM, VCA IgG, EBNA IgG e EA-D IgG.

O DNA do EBV foi encontrado em 2,56% dos soros sanguíneos, em 33,3% das salivas, em 25,6% dos carcinomas gástricos e em 23,1% das mucosas gástricas normais. Em 41% dos pacientes a pesquisa do genoma viral foi negativa. O número médio de cópias do DNA do EBV foi de 24 cópias/ μ g de DNA no soro, 6089 cópias/ μ g de DNA na saliva, 1728 cópias/ μ g de DNA nas biopsias gástricas tumorais e de 20 cópias/ μ g de DNA nas mucosas gástricas normais. Em termos serológicos, 93,1% dos CG EBV negativo, 90% dos CG EBV positivo e 100% do grupo controlo exibem uma infecção passada. Uma reactivação da infecção é verificada em 10% dos CG EBV positivo e 6,9% dos CG EBV negativos são seronegativos para o EBV. Nos carcinomas gástricos foi analisada por citometria de fluxo a ploidia do DNA, a proporção de células em fase S e a percentagem de células apoptose. Verificou-se que 61,3% dos tumores são diplóides, 38,7% são aneuplóides e destes, 16,7% são tetraplóides. A percentagem de células em fase S obtida foi de $24 \pm 13\%$, enquanto que a fracção de células em apoptose foi de $23,5 \pm 20,9\%$. A sobrevivência foi significativamente melhor nos doentes com carcinomas gástricos EBV negativos do que nos indivíduos com tumores associados ao EBV, 81,8% vs 60% ($p=0,012$).

Estes achados sugerem uma associação dos tumores gástricos com o EBV e esta variável emerge como um factor de pior prognóstico. A aneuploidia está correlacionada com uma elevada actividade proliferativa e a sua incidência é maior em tumores em estádios mais avançados e em carcinomas com histologia do tipo intestinal.

abstract

Epstein-Barr virus, frequently referred as EBV, is a member of the herpes virus family and one of the most common human herpes viruses. This virus occurs worldwide, and most people become infected with it sometime during their lives. EBV is the causative agent of infectious mononucleosis and has been linked to the development of several malignant tumors. Recently it was demonstrated his association with gastric carcinomas. High titers of EBV antibodies were found on gastric carcinoma (GC) patients, suggesting his involvement in the tumoral proliferation.

In this work, 39 individuals with gastric carcinoma had been studied. The detection of EBV DNA was performed by real time polymerase chain reaction (PCR) in serum, in saliva, in gastric tumor and in normal gastric mucous. The immunological status was established by the detection of EBV-specific antibodies - VCA IgM, EBNA IgM, VCA IgG, EBNA IgG and EA-D IgG using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

The DNA of the EBV was detected in 2,56% of serums, in 33,3% of the salivas, in 25,6% of the gastric carcinomas and in 23,1% of the normal gastric mucous. In 41% of the patients the search of the viral genome was negative. The mean EBV-DNA copy number in serums was 24 copies/ μ g of DNA, in salivas was 6089 copies/ μ g of DNA, in gastric tumor was 1728 copies/ μ g of DNA and in normal gastric mucous was 20 copies/ μ g of DNA. Serologic results indicated that 93,1% of the EBV negative GCs, 90% of the EBV positive GCs and 100% of the control group show a past infection. A reactivation of the infection was confirmed in 10% of EBV positive GCs; and 6,9% of EBV negative GCs were seronegatives. In addition, we examined by flow cytometry the DNA ploidy pattern, the S-phase fraction and the percentage of apoptotic cells. It was established that 61,3% of the tumors were diploids, 38,7% were aneuploids and 16,7% of those were tetraploids. The mean S-phase fraction was of $24 \pm 13\%$, while the apoptotic cells fraction was of $23,5 \pm 20,9\%$. The survival was significantly better in the EBV-negative carcinomas than EBV-positive carcinomas, 81,8% vs 60% ($p=0,012$).

These findings suggest an association of the gastric tumors with EBV and this variable emerges as a poorer prognostic factor. The aneuploidy is correlated with increased proliferation activity and it percentage is higher in tumors with more advanced stages and in carcinomas of intestinal-type.

Índice

Índice	I
Lista de Figuras	IV
Lista de Tabelas	V
Lista de Abreviaturas e Unidades	VI

1. Introdução	1
1.1. O Vírus Epstein-Barr	3
1.2. Estrutura	3
1.3. Genoma	4
1.4. Hospedeiros e células alvo	7
1.5. Fases da infecção viral	8
a. Adsorção e Penetração	8
b. Estabelecimento da latência ou iniciação da replicação viral	9
c. Infecção Lítica	18
d. Replicação do genoma viral	20
e. Infecção lítica tardia	21
f. Montagem das partículas virais	22
1.6. Fisiopatologia da infecção pelo EBV	22
1.7. Epidemiologia da infecção pelo EBV	24
1.8. Manifestações clínicas da infecção pelo EBV	25
a. Mononucleose Infecciosa	25
b. Leucoplasia oral pilosa	26
c. Tumores associados com o EBV	27
1.9. Carcinoma Gástrico	31
a. Anatomia do estômago	31
b. Epidemiologia do carcinoma gástrico	32
c. Factores predisponentes	32
d. Patologia e Prognóstico	33

e. Associação do EBV com o carcinoma gástrico	34
2. Objectivos	37
3. Material e métodos	41
3.1. População de estudo	43
3.2. Análise anatomopatológica do tumor	43
3.3. Detecção de anticorpos contra antígenos do EBV	44
a. Determinação dos anticorpos IgM para o antígeno viral da cápside (VCA) do EBV	44
b. Pesquisa dos anticorpos IgM para o antígeno nuclear 1 (EBNA-1) do EBV	45
c. Detecção dos anticorpos IgG para o antígeno viral da cápside (VCA) do EBV	45
d. Determinação dos anticorpos IgG para o antígeno nuclear 1 (EBNA-1) do EBV	46
e. Pesquisa dos anticorpos IgG para o antígeno precoce difuso (EA-D) do EBV	47
f. Detecção dos anticorpos IgG para o antígeno viral da cápside-p18 (VCA-p18) do EBV	47
g. Determinação dos resultados obtidos nas pesquisas serológicas	48
3.4. Extracção e purificação de DNA viral proveniente de saliva	48
3.5. Extracção e purificação de DNA viral procedente de soro sanguíneo	49
3.6. Extracção e purificação de DNA viral em biopsias (endoscópicas e cirúrgicas) gástricas congeladas	50
3.7. Extracção e purificação de DNA viral em biopsias gástricas incluídas em parafina	51
3.8. Quantificação de DNA	51
3.9. Detecção e quantificação do DNA viral nas diversas amostras por PCR em tempo real	52
a. Condições usadas na PCR em tempo real	53

3.10. Linha celular B95-8	55
3.11. Medição da apoptose em biopsias gástricas congeladas	55
3.12. Determinação da ploidia do DNA em biopsias gástricas congeladas	57
3.13. Determinação da ploidia do DNA em biopsias gástricas incluídas em parafina	58
3.14. Análise dos histogramas obtidos na determinação da ploidia do DNA em biopsias gástricas	59
 4. Resultados	 61
4.1. Análise anatomopatológica do tumor	63
4.2. Detecção de anticorpos contra antígenos do EBV	65
4.3. Quantificação do DNA viral nas diversas amostras por PCR em tempo real	67
4.4. Determinação da ploidia do DNA e da apoptose	68
 5. Discussão	 73
 6. Perspectivas futuras	 83
 7. Referências bibliográficas	 87
 8. Anexos	 103

Lista de Figuras

Figura 1– Representação esquemática da estrutura do vírus Epstein-Barr.	3
Figura 2– Organização do genoma do vírus Epstein-Barr na forma epissomal.	6
Figura 3– Padrão de expressão e regulação dos genes virais em células com infecção latente.	11
Figura 4– Modelo de interação do EBV com o hospedeiro durante a primo-infecção e infecção persistente.	23
Figura 5– Abordagem esquemática da anatomia do estômago.	31
Figura 6– Diagrama do modelo etiológico da carcinogénese gástrica.	33
Figura 7– Ilustração da PCR em tempo real realizada com a sonda “TaqMan”.	52
Figura 8– Título médio dos anticorpos VCA IgM, EBNA IgM, VCA IgG, EBNA IgG, EA IgG, VCA (p18) IgG para os grupos CG EBV negativo, CG EBV positivo e grupo controlo.	66
Figura 9– Distribuição da ploidia do DNA nos tumores e nas mucosas normais.	68
Figura 10 – Percentagem de células tumorais e da mucosa normal em fase S do ciclo celular.	69
Figura 11– Percentagem de células tumorais e da mucosa normal em apoptose.	70

Lista de Tabelas

Tabela I – Identificação dos produtos dos genes do EBV e as suas <i>open reading frames</i> (ORFs).	4
Tabela II – Sequências dos “primers” e da sonda utilizados na PCR em tempo real.	53
Tabela III– Relação entre a classificação anatomopatológica e a detecção do genoma do EBV nos tumores gástricos.	64
Tabela IV– Resultados obtidos na pesquisa dos vários anticorpos contra antígenos do EBV.	66
Tabela V– Resultados obtidos na pesquisa do DNA do EBV por PCR em tempo real nas várias amostras.	67
Tabela VI– Correlação do estágio dos tumores com a detecção e quantificação do DNA do EBV e com a ploidia do DNA.	71
Tabela VII– Definição da classificação TNM e do tipo histológico, segundo o <i>American Joint Committee on Cancer</i> (2002).	105

Lista de abreviaturas e unidades

aa: aminoácidos	IFN: interferão
Ag: antígeno	IgG: imunoglobulina G
Ala: alanina	IgM: imunoglobulina M
BCR: receptor das células B	IL: interleucina
Br-dUTP: bromodeoxiuridina trifosfatada	INE: instituto nacional de estatística
C: citosina	IR (1-4): sequências repetitivas internas
CG: carcinoma gástrico	JAK: <i>janus kinase 3</i>
Ct: <i>threshold cycle</i>	JNK/AP1: <i>c-jun N-terminal kinase and activator protein-1</i>
CTL: linfócitos T citotóxicos	kb: quilopares de bases
DH: doença de Hodgkin	kDa: quilodalton
DL e DR: sequências homólogas	LB: linfócitos B
DNA: ácido desoxirribonucleico	LMP: proteína membrana latente
DO: densidade óptica	LT: linfócitos T
EA-D: antígeno precoce difuso	mg: miligrama
EBERs: RNAs pequenos sem poliadenilação	MHC-I: complexo <i>major</i> de histocompatibilidade de classe I
EBNA: antígeno nuclear	MI: mononucleose infecciosa
EBV: vírus Epstein-Barr	ml: mililitro
ELISA: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	mm: milímetro
FAM: 6-carboxifluoresceína	mRNA: RNA mensageiro
FITC: isotiocianato de fluoresceína	mRNAs: RNAs mensageiro
G: guanina	NK: células <i>natural killer</i>
g: aceleração da gravidade	nm: nanómetro
Gly: glicina	OMS: organização mundial de saúde
gp: glicoproteína	ORF: <i>open reading frames</i>
HIV: vírus da imunodeficiência humana	Orilyt: origem de replicação viral lítica
HLA: <i>human leucocyte antigen</i>	OriP: origem de replicação viral latente
HVH-4: herpesvírus humano 4	p/v: peso/volume
	p38/MAPK: <i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>

PAS: ácido periódico de Schiff

pb: par de bases

PBS: tampão salino de fosfato

PCR: reacção de polimerização em cadeia

pH: logaritmo decimal negativo da concentração em iões de hidrogénio

PTLD: doença linfoproliferativa pós-transplante

Rb: retinoblastoma

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

S: fase de síntese do ciclo celular

SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC: sistema nervoso central

STAT: *signal transducer and activator of transcription*

TA: temperatura ambiente

TAMRA: 6-carboxitetrametilrodamina

TdT: enzima transferase deoxinucleotidil terminal

TMB: tetrametilbenzidina

TNF: factor de necrose tumoral

TR: sequência terminal repetitiva

U (1-5): sequências únicas

v/v: volume/volume

VCA: antígeno viral da cápside

µg: micrograma

µl: microlitro

µm: micrómetro

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Vírus Epstein-Barr

O Vírus Epstein-Barr (EBV) foi citado pela primeira vez em 1964, por Epstein e Barr e por Pulvertaft, no mesmo número da revista Lancet. A descoberta do vírus deveu-se a estudos realizados em linhas celulares linfoblásticas contínuas, estabelecidas a partir de biopsias de linfoma de Burkitt, nas quais observaram por microscopia electrónica partículas virais morfologicamente semelhantes ao grupo herpesvírus (Epstein e Barr, 1964 e Pulvertaft, 1964).

O EBV é um vírus humano pertencente à família *Herpesviridae*, sub-família *Gamaherpesvirinae* e ao género *Lymphocryptovirus*, sendo também denominado por herpesvírus humano 4 (HVH-4).

1.2. Estrutura

Tal como os outros herpesvírus, o EBV é um vírus de DNA com invólucro. Possui uma cápside proteica de simetria icosaédrica com 100 nm de diâmetro constituída por 162 capsómeros; um tegumento proteico entre a nucleocápside e o invólucro e um invólucro de natureza lipídica, derivado da membrana nuclear da célula hospedeira com espículas de origem glicoproteíca (Figura 1).

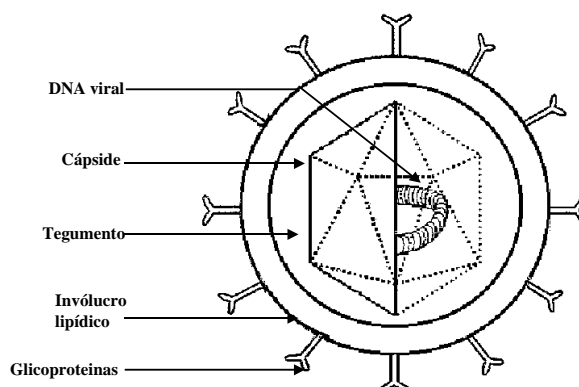


Figura 1– Representação esquemática da estrutura do vírus Epstein-Barr.

As proteínas da cápside, de maiores dimensões, são de 160, 47 e 28 kDa, semelhantes em tamanho às proteínas de maior dimensão da cápside do vírus herpes simplex 1. A nível do tegumento e do invólucro, encontram-se predominantemente duas proteínas de 350/220 e de 152 kDa e ao contrário, da maior parte dos herpesvírus, no invólucro externo predomina uma única glicoproteína, a gp350/220 (Fields e Knipe, 1996).

1.3. Genoma

O EBV foi o primeiro herpesvírus cujo o genoma foi completamente clonado (Dambaugh *et al.*, 1980) e sequenciado (Baer *et al.*, 1984). É constituído por uma molécula de DNA, de dupla cadeia linear, com 184 kb e uma percentagem de G+C de 60 moles. O genoma da estirpe B95-8 foi sequenciado tendo como base a sua digestão com a endonuclease *Bam*HI, o que condicionou a nomenclatura das *open reading frames* (ORFs) que é baseada no fragmento de restrição em que estão inseridas. Por exemplo, a ORF *BARF1* encontra-se à direita no fragmento A; a ORF *BLLF2* é a segunda ORF à esquerda no fragmento L (Tabela I) (IARC, 1997, Knipe e Howley, 2001).

Tabela I – Identificação dos produtos dos genes do EBV e as suas *open reading frames* (ORFs) (adaptada de IARC, 1997).

ORFs	Denominação usual	Função proposta
<i>Genes latentes</i>		
<i>BKRF1</i>	<i>EBNA-1</i>	Manutenção do plasmídeo
<i>BYRF1</i>	<i>EBNA-2</i>	<i>Trans</i> -ativador, transformação
<i>BERF1</i>	<i>EBNA-3A</i>	<i>Trans</i> -ativador, transformação
<i>BERF2</i>	<i>EBNA-3B</i>	Desconhecida
<i>BERF3/4</i>	<i>EBNA-3C</i>	<i>Trans</i> -ativador, transformação
<i>BWRF1</i>	<i>EBNA-LP</i>	<i>Trans</i> -ativador, transformação
<i>BNLF1</i>	<i>LMP-1</i>	Transformação
<i>BNRF1</i>	<i>LMP-2A/2B</i>	Manutenção da latência
<i>BARF0</i>		Desconhecida
<i>BHRF1</i>		Análoga do bcl-2

<i>Genes imediatamente precoces</i>		
<i>BZLF1</i>	<i>ZEBRA</i>	<i>Trans</i> -ativador, iniciação do ciclo lítico
<i>BRLF1</i>		<i>Trans</i> -ativador, iniciação do ciclo lítico
<i>BLRF4</i>		<i>Trans</i> -ativador, iniciação do ciclo lítico
<i>Genes precoces</i>		
<i>BMRF1</i>		<i>Trans</i> -ativador
<i>BALF2</i>	<i>p138</i>	Ligação ao DNA
<i>BALF5</i>		DNA polimerase
<i>BORF2</i>		Subunidade da reductase ribonucleotídica
<i>BARF1</i>		Subunidade da reductase ribonucleotídica
<i>BXLF1</i>		Timidina cinase
<i>BGLF5</i>		Exonuclease alcalina
<i>BSLF1</i>		Primase
<i>BBLF4</i>		Helicase
<i>BKRF3</i>		Glicosilase DNA uracil
<i>Genes tardios</i>		
<i>BLLF1</i>	<i>gp350/220</i>	Maior glicoproteína do invólucro
<i>BXLF2</i>	<i>gp85</i>	Fusão do invólucro viral com o hospedeiro
<i>BKRF2</i>	<i>gp25</i>	Fusão do invólucro viral com o hospedeiro
<i>BZLF2</i>	<i>gp42</i>	Fusão do invólucro viral com o hospedeiro; ligação ao MHC-II
<i>BALF4</i>	<i>gp110</i>	Desconhecida
<i>BDLF3</i>	<i>gp150</i>	Desconhecida
<i>BILF2</i>	<i>gp55/80</i>	Desconhecida
<i>BFRF1</i>		Desconhecida
<i>BCRF1</i>		Interleucina-10 viral
<i>BHRF1</i>		Análoga do <i>bcl-2</i>

Abreviaturas: EBNA, antígeno nuclear do EBV; LP, proteína “leader”; LMP, proteína membrana latente; gp, glicoproteína; MHC, complexo *major* de histocompatibilidade.

A análise computacional do genoma do EBV revelou a existência de aproximadamente 100 ORFs e de 30 genes que são divididos entre genes latentes e genes líticos (Farina *et al.*, 2000). O genoma do EBV é constituído por cinco sequências únicas (U1 à U5), separadas por quatro sequências repetitivas internas (IR1 a IR4) e por duas sequências homólogas (DL e DR) que funcionam como origens de replicação lítica – *OriLyt*, e que são delimitadas nas extremidades por duas sequências terminais repetitivas (TR) de 0.5 kb (Figura 2). As TR permitem a circularização do genoma sob forma de um epissoma que é uma característica na infecção latente deste vírus. Embora, a forma de epissoma seja a mais frequente, o genoma do EBV pode persistir na célula infectada através da sua integração no DNA cromossomal. Na linha celular linfoblastoide fetal humana IB4, múltiplas cópias do genoma são integradas em tandem no braço longo do cromossoma 4 (4q25). Contudo, a integração não é feita em locais específicos dos cromossomas, nem é uma característica comum na infecção pelo EBV.

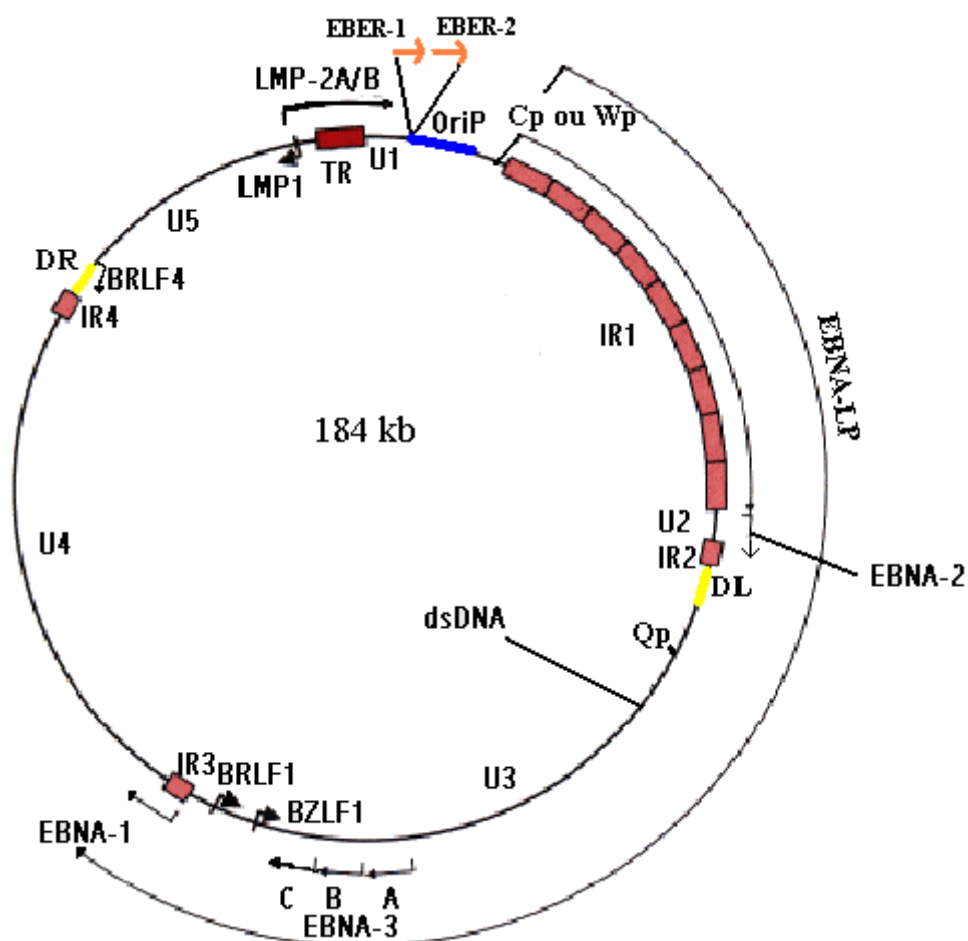


Figura 2– Organização do genoma do vírus Epstein-Barr na forma epissomal. O diagrama mostra a localização e transcrição dos genes virais latentes. A origem de

replicação do plasmídeo está demarcada a azul, as caixas representam os exões codificantes para cada gene latente e as setas indicam a direcção em que são transcritos. As proteínas latentes incluem seis antígenos nucleares (EBNAs 1, 2, 3A, 3B, 3C e EBNA-LP) e três proteínas membranares latentes (LMPs 1, 2A e 2B). A EBNA-LP é transcrita por um número variável de exões repetitivos. A LMP2A e a LMP2B são codificadas por múltiplos exões localizados em ambos os lados da TR, que é formada durante a circularização do DNA linear. As setas laranjas indicam dois RNAs pequenos sem poliadenilação e abundantemente transcritos, o EBER-1 e o EBER-2 (adaptado de Young e Murray, 2003).

Pelo menos dois tipos de EBV foram identificados na população humana (Bornkamm *et al.*, 1980) e designados por EBV-1 e EBV-2. A diferença entre os dois subtipos faz-se sentir nos genes que codificam algumas proteínas nucleares da infecção latente, a EBNA-2, a EBNA-LP, a EBNA-3A, 3B e 3C e os EBERs. Com particular expressão para os genes *EBNA-2* e *EBNA-LP*, em que as sequências nucleotídicas são mais conservadas nas regiões não codificantes do que nas regiões codificantes. Por exemplo, as sequências repetitivas IR1 e IR2, que flanqueiam o domínio U2, têm 99% de semelhanças entre os dois subtipos, enquanto que no mesmo domínio (U2) os exões codificantes do *EBNA-LP* e do *EBNA-2*, apresentam uma analogia de, respectivamente, 88% e 69%. Assim, o *EBNA-2* encontra-se sob maior pressão evolutiva divergente do que qualquer outra parte do genoma do EBV. Em termos de distribuição geográfica, em África predomina o subtipo 2 enquanto que na Europa e na América prevalece o subtipo 1.

1.4. Hospedeiros e células alvo

Em circunstâncias normais, a infecção pelo EBV está limitada aos humanos. Porém, anticorpos anti-EBV foram detectados em várias espécies de primatas, provavelmente devido a reacções cruzadas entre anticorpos contra vírus homólogos ao EBV específicos dessas espécies. Essa imunidade cruzada pode explicar o facto desses animais serem resistentes à infecção *in vitro*, embora os seus linfócitos B (LB) possam ser transformados *in vitro*.

O EBV é um vírus linfotrópico e a infecção dos LB é mediada pela interacção entre a glicoproteína do invólucro viral, a gp350 (gp340)/220 com o receptor celular da fracção C3d do sistema complemento, o CR2 (CD21). O conceito de que o EBV é predominantemente, senão exclusivamente, um vírus linfotrópico, foi posto em causa com base na sua detecção em células tumorais não-B, tais como certos linfomas das células T e outros carcinomas, acrescentando ainda o facto do receptor CD21 não ser exclusivo dos LB, existindo também nos linfócitos T (LT), nas células foliculares dendríticas do retículo e possivelmente em algumas células epiteliais. Para além disso, o tropismo celular do EBV não se restringe unicamente ao receptor CD21 uma vez que, o vírus foi detectado em células que não expressam o receptor CD21.

Estudos recentes, sugerem que a infecção pelo EBV em portadores crónicos, saudáveis limita-se basicamente aos LB, embora o vírus possa também ser detectado em células epiteliais não neoplásicas e em LT (IARC, 1997).

1.5. Fases da infecção viral

No homem a infecção pelo vírus Epstein-Barr tem início no epitélio da orofaringe, que é permissivo à replicação do vírus (Sixbey *et al.*, 1984), desenvolvendo-se uma infecção activa persistente que continuará durante muitos anos a um nível reduzido. No curso da infecção primária, o EBV infecta os LB porque na orofaringe, estes movimentam-se muito próximo da membrana epitelial. Os LB normais ou malignos que não estão completamente diferenciados em plasmócitos são normalmente susceptíveis à adsorção, penetração e estabelecimento de infecção latente, mas não à replicação viral. Quando LB normais são infectados *in vitro* podem ser clonados com elevada eficiência e cultivados indefinidamente em linhas celulares contínuas.

a. Adsorção e Penetração

Como referido anteriormente, a infecção das células B pelo EBV é mediada pela interacção entre o receptor celular CD21 e a glicoproteína viral gp350/220. Esta

glicoproteína não só intervém na adsorção viral mas também na fase inicial da penetração, em que o vírus entra na célula hospedeira por endocitose em vesículas de membrana lisa. O invólucro do EBV presumivelmente funde-se com a membrana da vesícula libertando a nucleocápside no citoplasma celular. Pensa-se que a gp350/220 poderá desempenhar algum papel na fusão do invólucro viral com a membrana da vesícula uma vez que, possui um domínio anfipático (Beisel *et al.*, 1985 e Tanner *et al.*, 1987). Porém, uma glicoproteína que parece ser importante neste evento é a gp85, já que, experiências com anticorpos monoclonais provaram que ela não afecta a adsorção viral, mas inibe a fusão do invólucro viral com a membrana celular (Miller e Hutt-Fletcher, 1988).

b. Estabelecimento da latência ou iniciação da replicação viral

Pouco é conhecido sobre a dissolução da cápside, transporte do genoma viral para o núcleo da célula hospedeira e circularização do DNA viral. Mas, por analogia com outros vírus de DNA que se replicam no núcleo da célula hospedeira, o citoesqueleto provavelmente mediará o transporte da cápside proteica para o núcleo (Fields e Knipe, 1996). A circularização do DNA ou precede ou coincide com a expressão dos genes virais imediatamente precoces e estudos revelaram que a síntese macromolecular é necessária para que esse facto ocorra.

O desencadear da infecção latente assenta sob dois fenómenos, a repressão do ciclo lítico e a conservação do genoma viral com localização intranuclear sob forma de epissoma e expressão dos genes de latência. Na fase de latência, grande parte do genoma viral sofre uma progressiva metilação, apesar dos domínios reguladores envolvidos na conservação da infecção latente, como a *oriP*, que é a origem da replicação viral latente permanecerem não metilados. A extensa metilação de parte do genoma que não é expresso na infecção latente, contribui para a conservação da fase de latência porque, inibe a expressão dos genes implicados no ciclo lítico (IARC, 1997).

A infecção dos LB pelo EBV tem como consequência habitual uma infecção latente e persistente e a transformação do crescimento celular originando uma perpetuação da proliferação celular. Contudo, após a infecção inicial, a célula infectada sofre alterações a nível do seu crescimento, porque o EBV induz a síntese de RNA, a secreção de

imunoglobulinas, a expressão de vários marcadores activadores dos LB, a síntese de DNA e a divisão celular.

i. Expressão dos genes virais na infecção latente

Na infecção latente dez genes são expressos; sendo que dois codificam RNAs pequenos sem poliadenilação (EBER-1 e EBER-2), outros dois codificam proteínas membranares latentes (LMP-1 e LMP-2) e ainda, seis genes codificam proteínas nucleares (EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C e LP) cuja transcrição se efectua por RNAs individuais produzidos por *splicing* alternativo, do mesmo transcrito primário, expresso a partir de um dos dois promotores, o *Bam*H1C (Cp) e o *Bam*HIW (Wp). Quarenta e oito horas após a infecção *in vitro* de LB humanos, as proteínas EBNA atingem um nível que é mantido durante a infecção latente. A EBNA-LP e a EBNA-2 são expressas numa fase inicial e alcançam o expoente máximo às 24 h, as EBNA-1, 3A, 3B e 3C são dificilmente detectáveis até que a quantidade de EBNA-LP e de EBNA-2 seja máxima. A expressão do EBER-1 e do EBER-2 é temporariamente correlacionável com a expressão das EBNA-1, 3A, 3B e 3C (Rooney *et al.*, 1989).

Pelo menos três formas de infecção latente, denominadas de latência I, latência II e latência III, foram detectadas em linhas celulares de LB e em biopsias tumorais (Figura 3). A latência I foi encontrada em células de linfoma de Burkitt positivas para o EBV. É caracterizada pela expressão dos EBERs e da EBNA-1 a partir de um mRNA *spliced* iniciado no promotor Qp e localizado no fragmento *Bam* HI F, e possivelmente pela expressão do produto da ORF *BARF0*. Na latência II são expressos os EBERs, a EBNA-1 conjuntamente com a LMP-1, a LMP-2B e ocasionalmente com a LMP-2A a partir de um promotor bidireccional localizado na região *Bam* HI N. Este tipo de latência foi citado em carcinomas da nasofaringe, em tumores de células T positivos para o EBV e na doença de Hodgkin. A latência III foi encontrada em linfomas imunoblásticos em pacientes imunocomprometidos e nela todos os genes latentes são expressos. Os três padrões de latência são regulados pela utilização de promotores alternados e por mecanismos de *splicing* alternativo. Uma forma adicional de latência caracterizada pela expressão reduzida dos EBERs, da EBNA-1 e da EBNA-2 foi descrita em tumores dos músculos lisos em

crianças imunocomprometidas e em doentes com o síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Lee *et al.*, 1995).

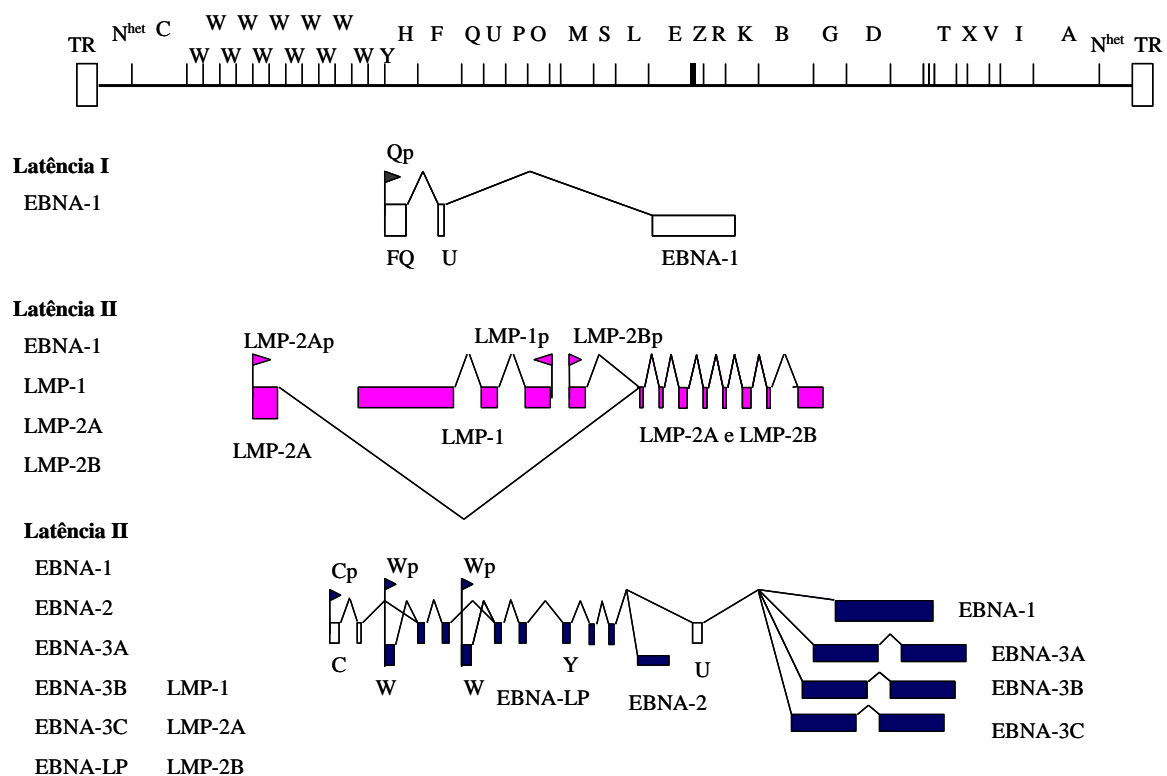


Figura 3— *Padrão de expressão e regulação dos genes virais em células com infecção latente. Os exões codificantes são identificados pelo local de iniciação das suas ORFs no mapa de restrição da BamHI. Os diferentes transcriptos são assinalados pelas caixas que simbolizam os exões, pelas chavetas que representam os intrões excisados e pelas bandeiras que correspondem aos promotores (Knipe e Howley, 2001).*

ii. Proteínas expressas na infecção latente

- EBNA-1

A EBNA-1 é expressa em todas as linhas celulares linfóides transformadas e em todos os tumores associados ao EBV (Raab-Traub, 2002).

Embora a grande parte das proteínas EBNA se associem ao DNA e presumivelmente sejam activas nessa forma, a EBNA-1 é singular em dois pontos: (i) é a única que se

associa aos cromossomas durante a mitose; (ii) e tem afinidade por uma sequência específica de DNA, o palindroma parcial “TAGGATAGCATATGCTACCC-AGATCCAG”, que é encontrado em três locais no genoma do EBV.

A importância fundamental da EBNA-1 manifesta-se a nível da replicação e manutenção do genoma do EBV na forma episomal, esta função é conseguida pela ligação da EBNA-1 à *oriP*. Para além da interacção com a *oriP*, a EBNA-1 também se encontra associada ao nucleoplasma e à cromatina e, na metáfase liga-se de uma forma dispersa a todos os cromossomas através do seu terminal carboxílico. Esta propriedade é essencial na segregação do episoma para o núcleo das células filhas durante a mitose (IARC, 1997). Estudos sugerem que a EBNA-1 funciona como um *trans*-activador transcripcional do promotor Cp e do promotor da LMP-1 (Young e Murray, 2003), o que revela um papel essencial nos fenómenos de crescimento e imortalização dos LB. Experiências com ratos transgénicos, demonstraram um envolvimento directo desta proteína no mecanismo de oncogénese uma vez que a sua expressão deu origem ao aparecimento de linfomas das células B (Young e Murray, 2003).

A proteína EBNA-1 possui uma sequência aminoacídica repetitiva, glicina-glicina-alanina (Gly-Gly-Ala), que actua como um *cis* inibidor do complexo *major* de histocompatibilidade de classe I (MHC-I). Este domínio repetitivo restringe a função apresentadora de antígenos destes receptores porque impede o processamento antigénico através da via ubiquitina-proteossoma (Levitskaya *et al.*, 1995), conduzindo a uma resposta pouco eficaz dos linfócitos T citotóxicos (CTL) contra células que expressem a EBNA-1 (Young e Murray, 2003), sendo esta proteína a única EBNA que continua a ser produzida durante a infecção lítica.

- EBNA-2

A sequência da EBNA-2 difere entre o EBV-1 e o EBV-2, facto que determina as diferenças biológicas que fazem com que as estirpes do tipo 1 transformem LB com grande eficácia (IARC, 1997). Nas duas estirpes, EBV-1 e EBV-2, as proteínas são constituídas, respectivamente por 491 e 443 aminoácidos (aa) (Hennesy e Kieff, 1985), são ácidas e possuem no mínimo sete domínios.

Estudos bioquímicos, demonstraram que a EBNA-2 encontra-se em grandes granulações nucleares e associada ao nucleoplasma, à cromatina e a fracções da matriz

nuclear. Tal como a EBNA-1, a EBNA-2 é fosforilada, mas as suas modificações pós-translacionais não se esgotam na fosforilação uma vez que o tamanho da proteína nascente é 10 kDa menor do que a da EBNA-2 intranuclear (Wang *et al.*, 1987). A EBNA-2 é a grande reguladora transcripcional dos genes virais e pensa-se que funciona directa ou indirectamente como uma *trans*-activadora de genes celulares e de genes virais, tais como o oncogene *c-fgr* (Knutson, 1990), os marcadores de activação de LB, entre estes o CD23 (Wang *et al.*, 1987a) e o CD21 (Wang *et al.*, 1990), a LMP-1 (Abbot *et al.*, 1990), a LMP-2 (Tsang *et al.*, 1991) e o promotor Cp (Sung *et al.*, 1991). Esta trans-activação induz a troca da utilização do promotor Wp para o promotor Cp que é observada na fase inicial da infecção dos LB. O seu mecanismo de actuação implica a sua interacção com uma proteína ubíqua de ligação ao DNA, a J κ , que é responsável por veicular a EBNA-2 a promotores que contenham uma sequência similar à da J κ (IARC, 1997). Outros trabalhos demonstraram que a EBNA-2 pode substituir, do ponto de vista funcional, uma região intracelular denominada de receptor *Notch*, que se sabe estar envolvida em tumores humanos das células T (Sakai *et al.*, 1998).

- EBNA-3A, 3B e 3C

EBNA-3A, 3B e 3C são codificadas por três genes localizados em tandem no genoma viral e possuem em comum a mesma origem.

As proteínas EBNA-3 são marcadamente hidrofílicas, em que 20% da totalidade dos seus aa são carregados. Os mRNA que codificam estas proteínas são os menos abundantes de todas as EBNAs, sendo poucas as moléculas encontradas nas células com infecção latente. As proteínas codificadas pelas estirpes 1 e 2 do EBV são idênticas em 84, 80 e 72% da sequência primária de aminoácidos (Sample *et al.*, 1990). As EBNA-3A, 3B e 3C encontram-se em grandes inclusões nucleares que enchem completamente o núcleo, poupando somente o nucléolo (Petti e Kieff, 1988). A distribuição destas três proteínas nucleares assemelha-se à da EBNA-2, sendo assim encontradas na matriz nuclear, na cromatina e no nucleoplasma. Tendo em conta a analogia nas suas estruturas e sequências, aponta-se para que estas proteínas sejam reguladores transcripcionais. Foi demonstrado que a EBNA-3C promove a expressão do mRNA do CD21 em células transfectadas de linfoma de Burkitt (Wang *et al.*, 1990) e a expressão da LMP-1 em células Raji (Allday *et al.*, 1993). Esta proteína está também envolvida na repressão do promotor Cp (Radkov *et*

al.,1997) e possivelmente interage com a proteína do retinoblastoma (pRb), promovendo a transformação celular (Parker *et al.*, 1996). A expressão da EBNA-3B parece estar correlacionada com uma regulação positiva da vimentina e do CD40 e com a regulação negativa do CD77 (Silins e Sculley, 1994). As EBNA-3A, 3B e 3C conseguem inibir a transcrição activa da EBNA-2 porque se associam com o factor de transcrição da RBP- Jk fazendo com que ele se dissocie da proteína Jk e consequentemente, da EBNA-2.

Sabe-se que a EBNA-3A e a EBNA-3C, ao contrário da EBNA-3B são essenciais para a transformação de LB *in vitro* (Young e Murray, 2003).

- EBNA-LP

A EBNA-LP é codificada pelo mRNA principal de cada EBNA e é traduzida a partir desses mRNAs quando o primeiro e segundo exão são excisados, criando assim o codão de iniciação da EBNA-LP (Fields e Knipe, 1996). A proteína originada é de tamanho variável dependendo do número de repetições de *Bam*HI W que contem cada isolado do vírus Epstein-Barr. A EBNA-LP encontra-se mais associada à matriz nuclear do que qualquer outra proteína nuclear. A sua localização, revelada por imunofluorescência, demonstrou que parte dela se encontra dispersa pelo núcleo, mas a restante está concentrada em pequenos grânulos nucleares (Wang *et al.*, 1987), sugerindo uma estrutura linear que poderá tratar-se dos transcritos do EBV (Lawrence *et al.*,1989). Assim, se a EBNA-LP está associada com o RNA nuclear do EBV, ela poderá desempenhar um papel crucial no seu processamento. Apesar de não ser imprescindível para a transformação *in vitro* dos LB é necessária para o crescimento das linhas celulares linfoblastóides. A EBNA-LP coopera com a EBNA-2 na regulação dos seus alvos transcripcionais, tais como a LMP-1 e a LMP-2 e também na regulação do promotor que determina um mRNA que por *splicing* alternativo origina ou a EBNA-2, ou a EBNA-LP ou as EBNAs-3 (Nitsche *et al.*, 1997, Raab-Traub, 2002).

- LMP-1

É a principal proteína transformante do EBV comportando-se como um oncogene clássico na transformação de linhas celulares fibroblastoídes e sendo essencial para a transformação *in vitro* dos LB induzida pelo EBV (Young e Murray, 2003).

O gene que codifica a LMP-1, apesar de não possuir um promotor forte, é dos mais transcritos e o seu mRNA é quase 10 vezes mais abundante do que o mRNA das EBNAs (Fennewald *et al.*, 1984). O produto codificado por três exões é uma proteína membranar integral de 63 kDa subdividida em três domínios: (i) um terminal N localizado no lado citoplasmático que orienta a LMP-1 para a membrana plasmática; (ii) seis hélices hidrofóbicas transmembranares que estão envolvidas na auto-agregação e oligomerização; (iii) um terminal C posicionado no lado citoplasmático da membrana que exibe a grande parte da actividade de sinalização da LMP-1 (Young e Murray, 2003). Pelo menos, metade da LMP-1 está associada ao citoesqueleto, como demonstrado pela elevada resistência em remove-la com detergentes não iónicos. A LMP-1 forma canais na membrana celular e ainda que, a vimentina esteja co-localizada a esses canais, parece que, nem ela nem outras proteínas do EBV estão envolvidas na formação dessas estruturas. Tal facto, deve-se à capacidade da LMP-1 interagir com ela própria através dos domínios transmembranares. Outras funcionalidades são-lhe atribuídas, tais como: (i) proteger os LB da apoptose por um mecanismo de indução da *bcl-2* (Rowe *et al.*, 1994); (ii) induzir a expressão de certas citocinas que promovem a actividade dos LB, como a IL-10; (iii) promover a expressão das moléculas de adesão dos LB, a LFA1 (CD11a/ CD18), a ICAM1 (CD54) e a LFA3 (CD58); (iv) actuar como membro da superfamília dos receptores do factor de necrose tumoral (TNF), activando várias vias de sinalização (Young e Murray, 2003); (v) e activar o factor de necrose- κ B através de um domínio adicional localizado na parte distal do terminal C. Conhecem-se mais três vias de sinalização: a JNK/AP-1, a p38/MAPK e a JAK/STAT que estão sob actuação da LMP-1 (Eliopoulos e Young, 1998, Eliopoulos *et al.*, 1999 e Gires *et al.*, 1999). A LMP-1 pode activar a cinase 3-fosfatidilinositol, uma cinase lipídica responsável pela activação de diversos mecanismos celulares em resposta a estímulos extracelulares, efeito que contribui para a oncogenicidade da LMP-1 (Dawson *et al.*, 2003).

- LMP-2A e LMP-2B

As LMP-2A e LMP-2B são codificadas por mRNAs *spliced* transcritos a partir de genes que circundam as TRs quando o genoma do EBV se encontra na forma circular. A transcrição da LMP-2A, inicia-se a 3 kb a jusante do local de poliadenilação da LMP-1, enquanto que a LMP-2B principia a 0.2 kb a montante do local de iniciação da transcrição

da LMP-1. A estrutura de ambas é semelhante, sendo constituídas por 12 domínios transmembranares e por um terminal C com 27 aa hidrofílicos, contudo, a LMP-2A possui ainda um terminal amino citoplasmático com 119 aa (Longnecker e Kieff, 1990). A tradução *in vitro* das LMP-2A e LMP-2B confirma que ambas têm localização membranar, sem que isso conduza a alterações significativas no seu tamanho (Fields e Knipe, 1996). Nenhuma destas proteínas é essencial para a transformação dos LB (Longnecker, 2000), mas estudos sugerem que a LMP-2A veiculada pelo seu terminal amino é responsável por bloquear a estimulação dos receptores das células B (BCR) através da mobilização de Ca^{2+} , a fosforilação da tirosina e a activação do ciclo lítico do EBV nos LB (Fields e Knipe, 1996). Foi demonstrado que a LMP-2A pode induzir a proliferação e sobrevivência dos LB na ausência de sinalização pelo BCR (Caldwell *et al.*, 1998). Em conjunto, estes dados confirmam a importância da LMP-2 na alteração do programa de desenvolvimento normal dos LB de forma a favorecer a permanência do EBV na medula óssea na forma latente e prevenir uma activação inapropriada do ciclo viral lítico. Estudos recentes, demonstram que a LMP-2A exerce actividade transformante sobre células epiteliais (Scholle *et al.*, 2000).

- Outros genes virais latentes

Os mRNAs codificados pelo *BHRF1* e pela ORF *BARF0* foram detectados em células com infecção latente, mas os seus produtos ainda não estão bem caracterizados.

- EBERs

Os dois RNAs pequenos intranucleares, não codificantes e sem poliadenilação são de sobremaneira os RNAs expressos em maior quantidade nas células com infecção latente, estimando-se que existam aproximadamente 10^5 cópias por célula (Raab-Traub, 2002) e provavelmente são expressos em todas as formas de latência. Os EBERs estão localizados no núcleo, associados pelo terminal 3' a várias proteínas celulares, nomeadamente o antígeno celular La, a proteína ribossomal L22 e a proteína PKR, formando ribonucleoproteínas estáveis. A PKR é uma proteína que medeia o efeito antiviral dos interferões e foi sugerido que uma inibição da PKR pelos EBERs poderá contribuir para a persistência do vírus. Em estirpes de EBV recombinantes, em que os EBERs foram excisados, verificou-se que conseguiam iniciar a infecção primária em LB e a

transformação do crescimento da mesma forma que a estirpe selvagem. Nenhuma diferença foi reportada no crescimento de linhas celulares linfoblastóides infectadas com a estirpe recombinante e a estirpe selvagem, nem mesmo na permissividade destas células pela infecção lítica (IARC, 1997). Porém, Komano e colaboradores (1999) verificaram que ao introduzirem os EBERs em células Akata de Linfoma de Burkitt, estas tornavam-se resistentes a indutores da apoptose, aumentando assim o seu potencial cancerígeno. Em geral, estes estudos apontam na direcção de que os EBERs, outrora considerados dispensáveis no fenómeno de transformação celular, poderão contribuir para a génese dos tumores associados ao EBV.

iii. A importância das proteínas latentes na transformação do crescimento celular

O conhecimento de como as proteínas latentes influenciam a transformação do crescimento celular foi conseguido através da transferência de genes para diversos tipos de células. Assim, vários estudos indicam que a proteína EBNA-2 possa estar directamente envolvida na transformação dos LB (Delius e Bornkamm, 1978; Bornkamm *et al.*; 1980, Heller *et al.*, 1981; Bornkamm *et al.*, 1982; Hayward *et al.*, 1982; Rabson *et al.*, 1982 e Jones *et al.*, 1984). O aumento da proliferação dos LB ocasionado pela EBNA-2 deve-se a que esta proteína actue como um trans-activador da expressão do CD23 e possivelmente de outros factores de crescimento autócrinos dos LB.

Experiências com a LMP, comprovaram que ela possui efeitos transformantes, que altera a morfologia celular e que torna possível células crescerem em meios suplementados com uma baixa concentração de soro. Em LB, a LMP induz modificações normalmente associadas com a activação celular, tais como agregação celular, aumento das vilosidades, amplificação da expressão do receptor da transferrina (CD71) e de moléculas de adesão celular (LFA-1, ICAM-1 e LFA-3). Liebowitz e colaboradores (1987) sugeriram que a actividade da LMP é em parte mediada pelos canais transmembranares que estão associados ao citoesqueleto. Esses canais, permitem que a LMP exerça uma função estimuladora no cálcio intracelular livre e em marcadores da actividade dos LB. Aponta-se para que a LMP actue na transdução membranar dos sinais de crescimento celular ou então como um canal de transporte de iões (IARC, 1997).

c. Infecção Lítica

A maior parte das linhas celulares com infecção latente contêm uma pequena percentagem de células que espontaneamente se tornam permissivas à replicação viral. Nessas células, o DNA viral é amplificado várias centenas de vezes a partir de uma origem de replicação viral lítica, a *oriLyt*. Formas multiméricas são sintetizadas a partir da *oriLyt* seguindo um padrão de replicação do DNA que poderá ter como modelo a replicação *rolling-circle*. Até agora foram identificados e caracterizados 20 genes líticos (Farina *et al.*, 2000), cuja expressão segue uma ordem temporal e sequencial. Alguns genes virais são expressos logo após a indução, independentemente da síntese de novas proteínas, sendo assim denominados de genes imediatamente precoces. Genes líticos precoces são expressos um pouco depois e a sua expressão não é afectada pela inibição da síntese do DNA viral. Genes cuja expressão ocorre geralmente após a síntese do DNA e é bloqueada por inibidores da síntese do DNA viral são designados de genes tardios. Um dos factores que desencadeiam a passagem do ciclo latente para o ciclo lítico é a expressão de duas proteínas virais transactivadoras, a BZLF1 e a BRLF1, que promovem uma expressão sequente de vários genes virais precoces e latentes e concomitantemente inibe alguns genes latentes, culminado em última instância com a morte celular e com a libertação de viriões infecciosos.

Células que se tornam permissivas à replicação viral sofrem várias mudanças citoplasmáticas que são típicas da infecção pelos herpesvírus, como a marginação da cromatina nuclear, a síntese do DNA viral na zona central do núcleo, a montagem das nucleocápsides na periferia nuclear, o envolvimento do vírus por uma membrana lipídica resultante da gemulação do vírus a partir da membrana nuclear interna e a inibição da síntese de macromoléculas do hospedeiro (IARC, 1997).

i. Genes imediatamente precoces

Na infecção pelos vírus herpes simplex os genes imediatamente precoces são definidos operacionalmente pela sua transcrição logo após a infecção na completa inibição de toda a síntese proteica. Neste vírus, há também uma proteína do virião que opera como um *trans*-activador da expressão dos genes imediatamente precoces. Na sequência temporal de

expressão dos genes do EBV na infecção latente a EBNA-LP e a EBNA-2 surgem e atingem níveis máximos antes que a EBNA-1, 3A, 3B, 3C e a LMP sejam detectadas. Portanto, a EBNA-LP e a EBNA-2 são óptimas candidatas a genes imediatamente precoces do ciclo latente (Fields e Knipe, 1996). A primeira tentativa em definir quais os genes imediatamente precoces (Sample *et al.*, 1984 e Sample *et al.*, 1986) detectou a presença selectiva de três RNAs transcritos dos fragmentos de DNA- *Bam* M, HF e A (Sample *et al.*, 1984). Um segundo estudo evidenciou que os mRNAs dos genes *BZLF1* e *BRFL1* eram expressos num nível elevado (Biggin *et al.*, 1987) e operavam como *trans*-activadores imediatamente precoces da expressão dos genes virais líticos precoces. A expressão da proteína ZLF1 (ZEBRA) inicialmente, activa a expressão da BRFL1 e as duas proteínas em conjunto estimulam os genes precoces e reprimem a expressão dos promotores Cp, Wp e do promotor da LMP (Mauser *et al.*, 2002).

A importância da proteína ZEBRA na oncogénese pode residir na sua interacção com dois genes celulares. Especificamente ela activa o gene *c-fos*, uma vez que se liga ao seu promotor e interacciona com a *p53* através de um dos seus domínios. A super-expressão da *p53* selvagem inibe a capacidade da proteína ZLF1 interromper a latência viral. Assim, uma interacção directa entre a *p53* e a proteína ZLF1 pode desempenhar um papel importante na regulação da alternância da infecção latente para a infecção lítica (IARC, 1997).

ii. Infecção lítica precoce

Os genes precoces englobam as regiões do genoma viral IR2 e IR4 (Figura 2) e são operacionalmente definidos pela sua síntese persistir, mesmo quando as células são induzidas à permissividade ou à superinfecção na presença de inibidores da síntese do DNA viral. Segundo este critério, pelo menos 30 mRNAs são precoces e outros 30 mRNAs são tardios (Baer *et al.*, 1984; Hudson *et al.*, 1985; Hudson *et al.*, 1985a; Gibson *et al.*, 1986; Sample *et al.*, 1986 e Biggin *et al.*, 1987). Os genes que codificam para os mRNAs precoces e tardios encontram-se misturados ao longo do genoma do EBV. Frequentemente, promotores diferentes iniciam transcrições *nested* que principiam com diferentes ORFs e terminam no mesmo local de poliadenilação. De maneira que o mRNA mais longo inclui todos os mRNAs mais curtos e as ORFs 3`.

Foram identificadas duas proteínas nucleares precoces – a SMLF1 (possivelmente uma proteína imediatamente precoce retardada) e a MRF1, que tal como as proteínas ZLF1 e RLF1 comportam-se como *trans*-activadores de outros genes virais precoces. Outras duas proteínas precoces muito abundantes foram mapeadas em sequências específicas do DNA – a proteína BALF2, que é homóloga a uma proteína do HSV que liga ao DNA, a ICP8 e desempenha um papel importante na replicação do DNA; e a proteína BHRF1 que exhibe uma homologia colinear com o *bcl-2* logo, protege da apoptose células de linfoma de Burkitt negativas para o EBV (Young *et al.*, 1999). Contudo, estirpes recombinantes de EBV às quais foi excisada a ORF da BHRF1 são capazes de iniciar e manter a transformação do crescimento celular, induzir o ciclo lítico e produzir novas partículas virais (Lee e Yates, 1992; Marchini *et al.*, 1991).

Vários genes precoces estão envolvidos na replicação do DNA. Estes encontram-se dispersos ao longo do domínio US do genoma vírico e codificam a DNA polimerase (*BALF5*), a maior proteína de ligação ao DNA (*BALF2*), uma reductase ribonucleotídica (*BORF2* e *BARF1*), uma timidina cinase (*BXLF1*) e uma exonuclease alcalina (*BGLF5*). A reductase ribonucleotídica está confinada a múltiplas regiões citoplasmáticas em células com infecção produtiva e foi citado que ela possa ser o principal componente do complexo *early antigen*. Experiências com células transfectadas evidenciaram que alguns destes genes são activados durante o mecanismo de diferenciação celular na ausência de outros produtos de genes virais, apontando uma provável função dos factores celulares na regulação do ciclo produtivo, pelo menos em alguns tipos de células (Marschall *et al.*, 1991).

Recentemente, foi descoberta uma nova proteína codificada pelo gene precoce *BFRF1*. Estudos revelaram tratar-se de uma proteína lítica localizada principalmente na membrana celular plasmática, mas também presente nos viriões (Farina *et al.*, 2000).

d. Replicação do genoma viral

Apesar da evidência inicial, a DNA polimerase viral não é necessária à replicação viral primária associada com a formação do epissoma (Rickinson e Epstein, 1978; Sixbey e Pagano, 1985). Todavia, como esperado, uma inibição da DNA polimerase bloqueia a actividade da origem viral lítica em células que se encontram no ciclo lítico. Com a

indução da replicação viral lítica, o número de cópias do epissoma aumenta sugerindo que a replicação do DNA epissomal actue como um precursor para a replicação subsequente (Shaw, 1985).

Dois segmentos do genoma do EBV, o DL e o DR, que são fortes promotores iniciais, também actuam como origem da replicação do DNA viral na infecção lítica.

e. Infecção lítica tardia

Os genes tardios englobam as regiões do genoma viral IR1 e IR3 (Figura 2) e codificam fundamentalmente proteínas estruturais ou proteínas que actuam como agentes modificadores das células infectadas, de forma a facilitar a progressão do ciclo viral ou a libertação dos vírus. Genes tardios com funções enzimáticas ou reguladoras ainda não foram identificados. Para além das glicoproteínas, que representam a grande fracção destes genes, outros genes latentes foram reportados, nomeadamente o *NRFI* que codifica a maior proteína da nucleocápside, a cLF1 e uma vez que, a sequência do *NRFI* não possui amplos domínios hidrofóbicos é mais provável que codifique uma proteína do tegumento do que uma proteína membrana integral. O *BXRF1* origina uma proteína básica que faz parte do core viral e o *BFRF3* codifica a VCA p18, uma proteína da cápside que é altamente imunogénica em humanos (van Grunsven *et al.*, 1994). Os genes que codificam as glicoproteínas são o *BLLF1* (gp350/220), o *BALF4* (gp110), o *BXLF2* (gp85), o *BILF2* (gp55/80), o *BDLF3* (gp100/150) e o *BZLF2* (gp42) (tabela I) (IARC, 1997). A gp110 é a proteína tardia mais abundante e estudos com microscopia electrónica localizaram-na na face interna e externa da membrana nuclear e em membranas citoplasmáticas que frequentemente rodeiam os vírus revestidos, mas não na membrana plasmática e nas membranas do aparelho de Golgi, apontando assim para que a proteína não seja processada no aparelho de Golgi. A gp85 e a gp350/220 são processadas no aparelho de Golgi e encontradas no vírus e na membrana plasmática das células com infecção lítica (IARC, 1997). A penetração viral engloba mais duas glicoproteínas virais a gp25 e a gp42, que formam um complexo tripartido com a gp85. A gp42 também liga às moléculas HLA (*human leucocyte antigen*), assim, o MHC classe II pode funcionar como co-factor na infecção dos LB humanos (Li *et al.*, 1997). A gp350/220, uma proteína viral externa que

medeia a adsorção viral com os receptores CD21 dos LB é a mais abundante na membrana plasmática das células infectadas e no invólucro viral. A principal fracção da resposta imunológica de anticorpos neutralizantes e de LT está dirigida contra a gp350/220 (Thorley-Lawson e Poodry, 1982; Ulaeto *et al.*, 1988), o que a torna um componente atractivo de potenciais vacinas para o EBV.

O gene tardio *BCRF1*, que está situado no meio do domínio regulador da EBNA, entre a *ori-P* e o Cp, é um homólogo do gene humano da IL-10. A sequência aminoacídica da BCRF1 é 90% semelhante à da IL-10 humana (Touitou *et al.*, 1996) e talvez por isso, a BCRF1 exiba grande parte das funções da IL-10 humana, incluindo a regulação negativa das funções de macrófagos e células *natural killer* (NK) e inibição da produção do interferão (IFN) γ . Assim, a IL-10 de expressão viral, pode ter um efeito local nessas respostas imunológicas a nível da reactivação da infecção. Quer a IL-10 humana, quer a IL-10 viral, são factores de crescimento que promovem a activação dos LB e de células transformadas com o EBV (Sairenji *et al.*, 1998).

f. Montagem das partículas virais

O empacotamento do DNA viral nas nucleocápsides segue a regra da “cabeça cheia”. Para tal, uma sequência de bases, C(G)₅TGT(T)₂CCT(G)₅CC, que está situada 25 bases antes do domínio DR1 poderá ser a sequência reconhecida para a clivagem do genoma. Em resumo, plasmídeos que possuam a origem de replicação da infecção latente, a origem de replicação da infecção lítica e as TRs são estáveis na forma de episoma em células com infecção latente, sendo replicados pela DNA polimerase viral em contactâmeros lineares quando a infecção lítica é induzida e depois clivados e empacotados nos viriões infecciosos.

1.6. Fisiopatologia da infecção pelo EBV

A figura 4, ilustra os eventos celulares que se pensa estarem envolvidos na infecção e persistência do EBV. A infecção primária ocorre por transmissão com células livres de

vírus e/ou células com infecção produtiva na saliva, estando associada com a entrada do vírus na população circulante de LB. Sixbey e colaboradores (1984) encontraram células epiteliais com infecção produtiva em lavados da orofaringe de indivíduos com mononucleose infecciosa (MI) em fase aguda. Sabe-se ainda que, o EBV também consegue replicar-se no epitélio escamoso estratificado da cavidade oral, como demonstrado nas lesões da leucoplasia oral pilosa. Não obstante, não é evidente se as células epiteliais são alvos primários do vírus transmitido por via oral ou se o vírus necessita primeiro de ser amplificado nos infiltrados de linfócitos locais, como por exemplo, nas criptas amigdalinas. Foi reportado que em lavados da orofaringe o EBV não foi detectado nas células epiteliais descamativas. Outras vias de entrada do vírus no epitélio da orofaringe foram sugeridas, como a fusão com infiltrados de linfócitos B infectados com EBV ou através de um complexo imune com a imunoglobulina A (IgA) anti-gp350 (IARC, 1997).

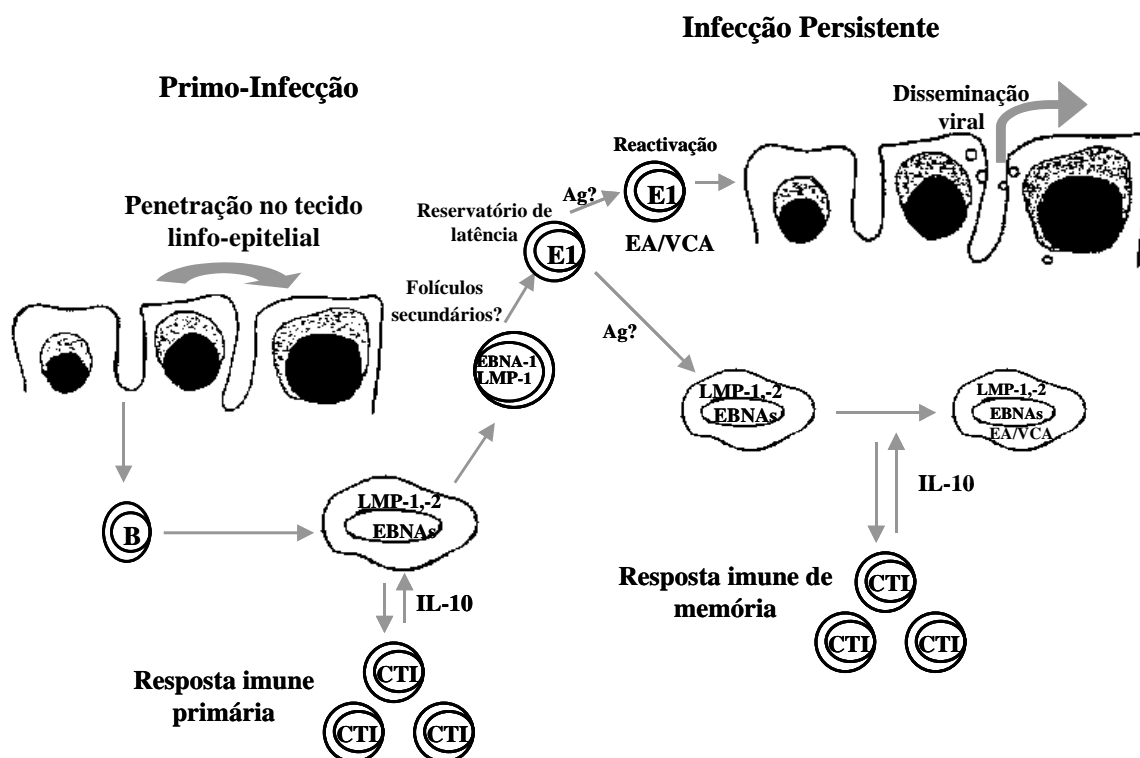


Figura 4– Modelo de interação do EBV com o hospedeiro durante a primo-infecção e infecção persistente. Abreviaturas: Ag, antígeno; EA, antígeno precoce; VCA, antígeno viral da cápside; EBNA, antígeno nuclear do EBV; E1, antígeno nuclear 1 do EBV; LMP, proteína membrana latente; IL, interleucina; CTL, linfócitos T citotóxicos (adaptada de IARC, 1997).

Os acontecimentos iniciais na infecção dos LB *in vivo* parecem assemelhar-se aos observados em infecções experimentais, tais como a transcrição pelos promotores Wp, Cp e LMP e a expressão de todo o espectro de proteínas latentes (Tierney *et al.*, 1994). Este padrão de expressão dos genes virais latentes exerce dois efeitos importantes no sentido de que a persistência viral se estabeleça no sistema linfóide. O primeiro, induz na fase inicial da infecção uma rápida expansão policlonal da população de células B infectadas, antes que se desenvolva uma resposta imune celular por parte dos CTL. O segundo efeito, está relacionado com a LMP-1 e a sua capacidade de estimular duas proteínas celulares, a bcl-2 e a A20, que fomentam o aumento da sobrevivência celular *in vivo*. Como supra referido, na fase primária da infecção desencadeia-se uma resposta imune celular levada a cabo pelos CTL que elimina grande parte das células infectadas. Facto que se pode correlacionar com a diminuição da excreção viral na orofaringe. Porém, esta resposta imune não extingue a replicação viral na cavidade oral nem a população leucocitária portadora do vírus em estado latente. Nesta linha de investigação, outros estudos vieram acrescentar que os LB com infecção latente são necessários e suficientes para a permanência do vírus e que a infecção epitelial poderá depender da eliminação viral pelo reservatório linfóide (Gratama *et al.*, 1992).

A persistência dos LB infectados com o EBV, em indivíduos saudáveis portadores do vírus, parece estar relacionada com uma forma de latência diferente da que é observada na infecção primária. A reacção de polimerização em cadeia (PCR) dos transcritos virais de LB circulantes obtidos de dadores saudáveis, mostrou somente a expressão dos mRNAs da EBNA-1 e da LMP-2A (Chen *et al.*, 1995). Um modelo de expressão tão restrito é consistente com a ideia de que as células portadoras de EBV possuem um fenótipo quiescente, o que de certa forma explica a sua evasão face a uma resposta imune tão eficiente por parte dos CTL.

1.7. Epidemiologia da infecção pelo EBV

Diversos estudos seroepidemiológicos comprovaram que o EBV é ubíquo por todo o mundo, mesmo nas populações mais remotas como os habitantes das ilhas Aleútes no Alaska e nas tribos da Amazónia (IARC, 1997).

Pela terceira década de vida, 80-100% dos indivíduos tornaram-se seropositivos para o EBV. A idade da seroconversão é inversamente proporcional com o nível de desenvolvimento socio-económico, com a dimensão do agregado familiar e com padrões de higiene. A via oral é a principal via de transmissão, no entanto, a transmissão por transfusões sanguíneas também está documentada (Gerber *et al.*, 1969). Estudos recentes detectaram o vírus em secreções genitais femininas e masculinas (van Baarle *et al.*, 2000; Enbom *et al.*, 2001; Crawford *et al.*, 2002) apontando para que o EBV também possa ser disseminado por via sexual. A transmissão pela saliva, provavelmente, ocorre por contacto oral íntimo e por resíduos de saliva presentes em copos, comida, brinquedos e outros objectos. Foi demonstrado que pelo menos 15-20% dos indivíduos assintomáticos seropositivos para o EBV excretam o vírus activo na saliva (Chang *et al.*, 1973; Strauch *et al.*, 1987). Mas se a saliva for concentrada, por ultracentrifugação, este número cresce para aproximadamente 75%. Isto sugere uma contínua replicação viral na orofaringe, porém, menos intensa que na primo-infecção. Mais de 85% dos pacientes sintomáticos em fase aguda expelem o EBV e mesmo passado vários meses após a fase aguda continuam a eliminar o vírus na saliva de uma forma intermitente (Miller *et al.*, 1973; Niederman *et al.*, 1976).

Em países em vias de desenvolvimento a infecção é adquirida nos primeiros anos de vida, enquanto que nos países desenvolvidos a primo-infecção é retardada até à adolescência, período em que a transmissão é mais provável de ocorrer devido ao contacto oral íntimo. Cerca de 50% das primo-infecções durante a adolescência originam uma forma sintomática, denominada de mononucleose infecciosa (IARC, 1997).

1.8. Manifestações clínicas da infecção pelo EBV

a. Mononucleose Infecciosa

A mononucleose infecciosa é uma patologia com maior incidência em crianças mais velhas, adolescentes e jovens adultos. Após um período de incubação de 30-50 dias, surgem os sintomas característicos, febre, dor de garganta, amigdalite, linfadenopatias e esplenomegalia. O diagnóstico da MI baseia-se na detecção de células linfóides atípicas no

sangue periférico, na pesquisa do DNA viral em tecidos do paciente e na seroconversão para o EBV. Na grande parte dos casos, em poucas semanas, a doença segue um curso benigno, mas situações mais prolongadas também são descritas. Como primo-infecção é normalmente assintomática, todavia, na maior parte das infecções sintomáticas apesar do quadro clínico não diferir muito do da MI é mais ténue. Não obstante a MI ser normalmente uma doença benigna e auto-limitada, complicações podem surgir como consequência da infiltração tecidular por LB infectados e por LT activados ou então pela intervenção de auto-anticorpos.

Esta doença corresponde a uma desordem linfoproliferativa benigna com expansão proeminente dos tecidos linfóides por numerosos blastócitos B activados. Estudos histológicos, morfológicos e moleculares, demonstraram uma proliferação de blastócitos B policlonais infectados com o EBV, acompanhado de um aumento de LT activados (Niedobitek *et al.*, 1997) e uma latência viral do tipo III.

O controle da primo-infecção e a transição para um estado de portador assintomático é mediado pela imunidade celular T. Callan e colaboradores (1996) corroboraram este registo quando observaram que na fase aguda da MI ocorre uma expansão clonal de LT CD8+ induzida pela presença antigénica. Situações em que o controle da infecção primária pelos LT falha e se desenvolve uma forma de MI fatal, podem ser consequência de um defeito genético, como a síndrome linfoproliferativa associada ao cromossoma X. Pacientes com esta desordem, sofrem de um defeito imune que os torna sensíveis a doenças induzidas pelo EBV. Casos esporádicos de MI fatal em que não existe uma associação com deficiências na imunidade mediada pelas células T também podem ocorrer e a grande maioria parece estar relacionada com uma hiper proliferação de LB policlonais. Contudo, em alguns casos a proliferação dos LB é monoclonal originando assim linfomas malignos (IARC, 1997).

b. Leucoplasia oral pilosa

É uma lesão epitelial da língua que foi originalmente descrita em doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), mas também foi encontrada em indivíduos transplantados imunocomprometidos. Esta patologia, manifesta-se através de lesões salientes e esbranquiçadas situadas nos bordos da língua, mas que se podem

estender a outros locais da mucosa oral. Em 1985, o DNA do EBV foi pela primeira vez encontrado nestas lesões e a localização do vírus restringida às células epiteliais superficiais. A presença de DNA viral na forma linear e a expressão de antígenos virais do ciclo lítico (BZLF1 e o VCA) indicam que as células epiteliais suportam a replicação viral (IARC, 1997).

c. Tumores associados com o EBV

i. Linfoma de Burkitt

O Linfoma de Burkitt existe em todo o mundo, contudo certas áreas apresentam uma maior incidência, nomeadamente, a África Equatorial e a Papua Nova Guiné com aproximadamente 5 a 10 casos anuais por 100000 habitantes. A média de idades dos pacientes nas regiões endémicas é bastante constante variando entre 7,7 e 9,2 anos de idade, enquanto que os tumores oriundos de outros locais são mais frequentes em crianças mais velhas. Cerca de 60% das crianças afectadas com Linfoma de Burkitt apresentam um inchaço unilateral da mandíbula. Caracteristicamente o tumor da mandíbula é o sinal de apresentação em crianças pequenas, tal como, massas abdominais o são em crianças mais velhas. Os tumores da mandíbula são menos frequentes fora das regiões endémicas de África.

A associação do EBV com o linfoma de Burkitt é baseada na detecção do genoma viral em células tumorais e na conversão serológica. Verificou-se que, 90% dos linfomas provenientes das áreas endémicas eram positivos para o EBV, enquanto que, nos linfomas procedentes de outros locais, somente em 15% foi detectado o genoma do vírus (Young e Murray, 2003).

Uma característica consistente com todos os Linfoma de Burkitt é a translocação cromossomal envolvendo o braço longo do cromossoma 8 (8q24) na região do proto-oncogene *c-myc* com o cromossoma 14 no gene que codifica a cadeia pesada das imunoglobulinas, ou ainda, mas menos frequentemente, com os cromossomas 2 ou 22 na região dos genes que codificam para a cadeia leve das imunoglobulinas. Estas translocações resultam na desregulação da expressão do oncogene *c-myc*.

A função que o EBV poderá desempenhar na patogénese do linfoma de Burkitt permanece ainda desconhecida. Mas, a detecção de formas monoclonais do epissoma viral em biopsias de linfoma de Burkitt positivos para o EBV aponta para que a infecção viral anteceda a proliferação dos LB percursores. Estudos recentes, revelam um envolvimento do EBV nos casos esporádicos de linfoma de Burkitt sugerindo um mecanismo de *hit and run* que compreende o rearranjo e desaparecimento do DNA viral durante a progressão tumoral (Razzouk *et al.*, 1996).

ii. Carcinoma da nasofaringe

O carcinoma não diferenciado da nasofaringe é o tumor que apresenta uma associação mais consistente com o EBV e é caracterizado pela presença de células tumorais não diferenciadas com infiltração linfocitária.

Histologicamente foi descrito pela primeira vez em 1921, mas a relação entre o EBV e o carcinoma só foi citada em 1966 com base em estudos serológicos e mais tarde na detecção do genoma viral e do complexo EBNA nas células tumorais por hibridação *in situ*. É mais frequente em adultos entre os 20 e os 50 anos, embora em certas regiões africanas possa afectar crianças e adolescentes (Fields e Knipe, 1996). A incidência anual deste carcinoma é baixa (1 em 100000 habitantes), exceptuando na China e no Sudoeste asiático onde atinge uma taxa de 20 a 30 casos por 100000 habitantes (Young e Murray, 2003). Para esta elevada frequência foram sugeridos factores ambientais de risco (fumeiros, tabaco, peixe curado em sal), mas principalmente factores genéticos predisponentes.

O genoma do EBV foi descoberto em quase todas as biopsias procedentes de carcinomas não diferenciados da nasofaringe a nível das células epiteliais tumorais, com expressão da EBNA-1 e dos EBERs e adicionalmente, em 65% dos casos também foi encontrada a LMP-1 (Niedobitek *et al.*, 1992), apesar da sua detecção depender da sensibilidade do método usado. Estudos efectuados com a técnica de PCR evidenciaram a presença da LMP-2A (Brooks *et al.*, 1993).

iii. Doenças linfoproliferativas em imunodeficientes

As doenças linfoproliferativas que surgem pós transplante por imunossupressão iatrogénica são designadas por doenças linfoproliferativas pós-transplante (PTLD). Porém, carcinomas semelhantes são observados em pacientes com outras formas de imunodeficiência, nomeadamente, a hereditária e a adquirida por infecção com o HIV. Estes linfomas, têm normalmente origem em células B e as lesões podem variar desde linfomas proliferativos policlonais de células B que geralmente regredem após suspensão da terapêutica imunossupressora até linfomas monoclonais não Hodgkin que usualmente não retrocedem após recuperação imunológica. Nos transplantados, a perigosidade parece ser maior se a primo-infecção ocorrer no período de transplantação ou imediatamente depois (Ho *et al.*, 1985). A maior parte das PTLDs são EBV positivas e apresentam um padrão de latência do tipo III (Young e Murray, 2003).

iv. Doença de Hodgkin (DH)

O EBV foi detectado em aproximadamente metade dos casos oriundos de países desenvolvidos e uma proporção ainda maior foi referida nos tumores com origem em países em vias de desenvolvimento. O genoma viral foi encontrado na forma monoclonal, indicando que a infecção das células tumorais ocorreu antes da expansão clonal (Young e Murray, 2003). Em 6% dos casos da DH, verificou-se a expressão da proteína ZEBRA (Pallesen *et al.*, 1991) estando esta presente em 1% das células tumorais (Brousset *et al.*, 1993), o que sugere a existência de ciclos abortivos.

A associação do EBV com a DH denota um padrão etário sendo mais frequente em indivíduos idosos e em crianças do que em jovens adultos (Armstrong *et al.*, 1998).

v. Linfomas das células T

O EBV tem sido associado a diversos linfomas das células T, em particular aos linfomas T sinonasais. Estes possuem um fenótipo e genótipo peculiar caracterizado pela ausência frequente de antígenos de LT, pela expressão dos marcadores celulares das

células NK e pela inexistência de rearranjos no gene que codifica o receptor celular dos LT.

Um aspecto singular nos linfomas das células T é a detecção do EBV em apenas 5 a 50% das células tumorais, o que indica uma infecção viral subsequente ao desenvolvimento tumoral (Young e Murray, 2003), sugerindo que o vírus confira uma vantagem adicional na sobrevivência e crescimento das células T transformadas.

Um grupo de investigadores (Brink *et al.*, 2000) apontou para que a origem destes tumores advenha da infecção dos CTL durante a resposta imunológica contra células infectadas com o EBV, uma vez que a grande parte dos linfomas das células T exibem um fenótipo citotóxico.

1.9. Carcinoma Gástrico

a. Anatomia do estômago

O estômago possui uma configuração variável, mas normalmente é em forma de J; anatomicamente é constituído por 5 zonas. O cardia, a zona mais estreita do estômago, localizado imediatamente a seguir à junção gastroesofágica é constituído predominantemente por células secretoras de mucina. Mediante uma linha circunferencial imaginária, desenhada através da *incisura angularis* na pequena curvatura, este órgão é dividido em parte proximal e parte distal. A parte proximal é denominada de corpo e compreende células mucosas, células parietais e células principais. A porção do estômago acima do nível da junção com o esófago é designada de fundo. O antro pilórico é constituído por células produtoras de muco e células endócrinas e está demarcada do duodeno pelo esfíncter piloro (Figura 5).

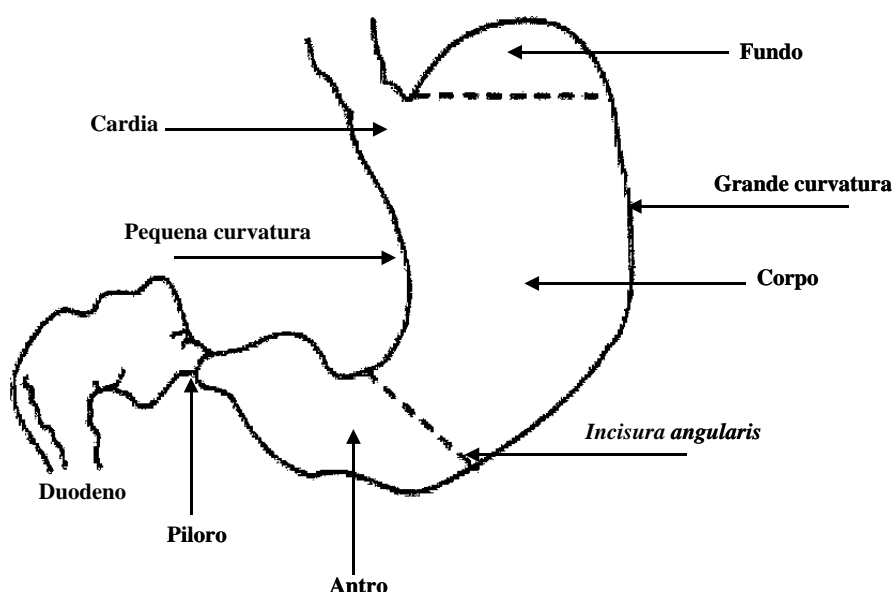


Figura 5– Abordagem esquemática da anatomia do estômago.

A parede do estômago é uma estrutura complexa, constituída por 5 camadas; a partir do lúmen gástrico ordenam-se em mucosa, submucosa, camada muscular, subserosa e serosa.

b. Epidemiologia do carcinoma gástrico

De acordo com as estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o ano de 2001, o cancro do estômago foi apontado como a segunda maior causa de morte por cancro em todo o mundo. Uma variação geográfica denota-se na incidência desta doença, assim, as maiores taxas de mortalidade observam-se no Chile, no Japão e na região da antiga União Soviética (Tunaci, 2002). Em Portugal, apesar do declínio, os dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) indicam que o carcinoma gástrico (CG) no conjunto dos dois sexos é o segundo tumor maligno que mais mata em Portugal. Com efeito, no ano de 2001 foi responsável pelo óbito de 2578 portugueses. É uma patologia com maior incidência em idosos, a idade média no diagnóstico é de 65 anos (variando entre 40-70 anos) e maior frequência em homens do que em mulheres (OMS, 2002).

c. Factores predisponentes

Factores ambientais desempenham um importante papel no desenvolvimento do carcinoma gástrico. Pensa-se que, as diferenças geográficas se devam a hábitos alimentares diferentes. Uma dieta rica em sal, nitritos, benzopirenos e alimentos mal preservados está provada que aumenta o risco de carcinoma gástrico enquanto que, uma dieta rica em vitamina C, com fruta e vegetais pode ter um efeito protector. Por outro lado, a infecção pelo *Helicobacter pylori* é outro grande factor de risco no desenvolvimento desta patologia. Em 1994, a OMS, considerou o *H. pylori* um carcinogénico do tipo I para adenocarcinomas gástricos e para tumores gástricos do tecido linfóide associados com a mucosa. A gastrite crónica atrofica, a anemia perniciosa, os pólipos gástricos neoplásticos, a gastrectomia parcial, a doença de Menetrier e os factores hereditários são também condições predisponentes (Tunaci *et al.*, 2002).

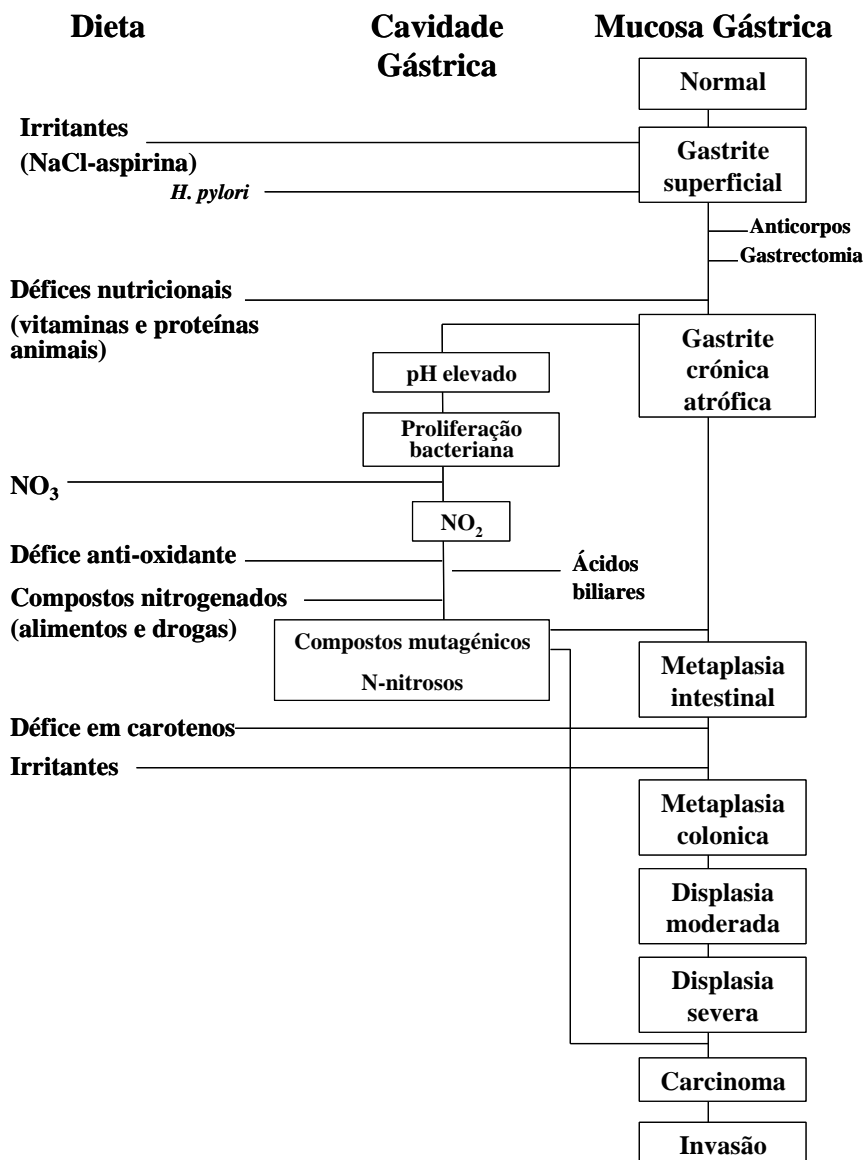


Figura 6– Diagrama do modelo etiológico da carcinogénese gástrica (adaptado de Correa, 1988).

d. Patologia e Prognóstico

Os adenocarcinomas do estômago representam entre 90 a 95% da totalidade dos tumores gástricos, seguidos pelos linfomas (2%), leiomiomas (2%), carcinóides (1%), adenoacantomas (1%) e pelo carcinoma das células escamosas (1%).

O carcinoma gástrico permanece como uma patologia de difícil cura, principalmente, porque quando o diagnóstico é efectuado a doença já se encontra num estado bastante

avanzado. Mesmo pacientes que apresentam uma condição mais favorável e efectuam cirurgia curativa, normalmente morrem de recorrência desta patologia. A taxa média de sobrevivência após os 5 anos sobre a cirurgia curativa ronda os 20-40%, mas o prognóstico depende bastante do estágio em que se encontra a doença (Danesi *et al.*, 2000 e Tunaci, 2002)

e. Associação do EBV com o carcinoma gástrico

A presença do DNA do EBV em carcinomas gástricos foi detectada pela primeira vez em 1990, utilizando a técnica de PCR (Burke *et al.*, 1990). Estudos em adenocarcinomas gástricos revelaram a presença do vírus em 2-16% dos casos (Herrmann e Niedobitek, 2003). Porém, nos carcinomas gástricos com estroma linfóide, a percentagem é bastante mais elevada, 80-100% dos casos são positivos para o vírus (Luqmani *et al.*, 2001). A eliminação periódica do EBV na saliva poderá ser uma via de infecção crónica do tracto gastrointestinal.

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de esclarecer o papel que o EBV poderá desempenhar na génese do carcinoma gástrico. Herrera-Goepfert e colaboradores (1999) referiram a presença de formas clonais do epissoma viral no núcleo de células epiteliais gástricas cancerosas, tal facto, sugere que a infecção viral do epitélio gástrico ocorra antes ou nos estágios iniciais da carcinogénese. Iwasaki e colaboradores (1998) vieram acrescentar que as células gástricas tumorais são permissivas à infecção latente apresentando um padrão de latência intermédio entre a latência I e a II, uma vez que, exprimem os EBERs, a EBNA-1, o BARF0 e a LMP-2A. Não obstante, em 1992, os estudos de Niedobitek e colaboradores, em carcinomas gástricos indiferenciados do tipo linfo-epitelial, vieram revelar a expressão de genes virais envolvidos no ciclo lítico. Este achado, foi corroborado por Hoshikawa e colaboradores (2002) noutros carcinomas gástricos positivos para o EBV. Estudos apontam para que a infecção viral e as proteínas associadas sejam protectoras contra o mecanismo de apoptose ou que o EBV induza mutações ou alterações na expressão de oncogenes e de genes supressores tumorais. Um grupo de investigadores observou que os genes mais frequentemente mutados nos tumores gástricos são: o *bcl-2*, o *c-myc*, o *p53*, o *ras*, o *p21* e o *Rb* e que, nos carcinomas infectados

com o EBV a expressão da *p53* encontra-se suprimida nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral (Ishii *et al.*, 2001). Ohfuji e colaboradores (1996) estudaram carcinomas gástricos com estroma linfóide e verificaram que os positivos para o EBV apresentavam uma percentagem de células em apoptose inferior e um aumento na expressão do gene *bcl-2*.

Sendo o cancro do estômago anualmente responsável pela morte de 850000 pessoas em todo o mundo (OMS, 2002) e tendo em conta os dados atrás expostos sobre a capacidade oncogénica do vírus EBV e a associação evidenciada a certos carcinomas justifica o trabalho agora apresentado. Assim, procurámos contribuir para o conhecimento da realidade portuguesa sobre a associação do EBV com o CG e melhorar outros conhecimentos sobre a progressão tumoral, assim como definir marcadores de prognóstico de evolução tumoral na tentativa de encontrar factores de pior prognóstico característicos destes tumores.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objectivo geral aferir a associação do vírus EBV com tumores gástricos e quantificar o genoma viral presente nas várias amostras biológicas estudadas. Para este fim, foram utilizados estudos de biologia molecular, nomeadamente, a técnica de PCR em tempo real e também análises serológicas que permitiram avaliar a imunidade humoral com a detecção de anticorpos específicos para o EBV, de maneira a delinear o perfil serológico. Estudou-se ainda a possível associação de determinados tipos de carcinomas gástricos com a presença do EBV, tentando perceber o papel do vírus nesses tumores. Assim, para além da classificação histológica, outros parâmetros foram estudados para melhor caracterização dos tumores gástricos, tais como a ploidia do DNA e a percentagem de células em apoptose. Em última análise procurámos correlacionar todos os achados supramencionados com a evolução clínica do doente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População de estudo

Foram estudados 39 pacientes, 19 homens e 20 mulheres, com idade média de $63 \pm 9,34$ anos em que o mais jovem tinha 39 anos e o mais idoso tinha 80 anos de idade, com diagnóstico histológico de carcinoma gástrico, provenientes dos serviços de Gastroenterologia e Cirurgia do Centro Regional de Oncologia de Coimbra, IPOFG, SA (CROC) e dos Hospitais Universitários de Coimbra. De cada doente, foi colhido soro sanguíneo, saliva ou gargarejo, tumor e mucosa normal da peça cirúrgica ou de biopsias incisionais. O grupo controlo, procedente do serviço de Gastroenterologia dos Hospitais Universitários de Coimbra é constituído por 4 indivíduos que apresentavam queixas gástricas mas, aos quais, não foi diagnosticado carcinoma gástrico. Após a recolha, as amostras foram congeladas a -80°C até posterior processamento.

3.2. Análise anatomopatológica do tumor

A análise anatomopatológica do tumor foi efectuada nos Serviços de Anatomia Patológica dos referidos hospitais.

O material obtido a partir de biopsias incisionais e peças cirúrgicas foi fixado em formol tamponado e incluído Histosec®. Do bloco de parafina efectuaram-se vários cortes de 3 μm que, por rotina, foram corados com hematoxilina-eosina, PAS, azul de Alcian e Giemsa. O relatório final inclui a classificação histológica, o grau, a profundidade de invasão em margens, a invasão vascular, as metástases nos gânglios linfáticos, as lesões associadas, a classificação pTNM e a classificação ICD-O.

3.3. Detecção de anticorpos contra antígenos do EBV

a. Determinação dos anticorpos IgM para o antígeno viral da cápside (VCA) do EBV

A determinação dos anticorpos IgM para o antígeno viral da cápside (VCA) do EBV foi executada utilizando o *Epstein-Barr Virus viral capsid antigen (VCA) IgM ELISA* (PanBio, Windsor, Austrália), seguindo as instruções do fabricante. Este teste, destina-se à detecção qualitativa dos anticorpos IgM para o VCA, que é o primeiro marcador usado no diagnóstico da infecção pelo EBV, uma vez que, estes anticorpos aparecem na primeira semana do período de incubação e podem ser detectados 4 a 6 meses após a infecção aguda.

Antes do início do ensaio foi assegurado que todos os reagentes se encontravam à temperatura ambiente (TA), 20-25°C. Foram efectuadas diluições do controlo negativo, controlo positivo, calibrador *cut-off* em triplicado e das amostras. Para tal, adicionaram-se 10 µl de soro a 90 µl do diluente de soro, seguido de agitação no vórtex. A 20 µl do soro diluído (passo anterior) acrescentou-se 180 µl do absorvente de IgGs presentes no soro. A diluição final do soro absorvido é de 1:100. Pipetaram-se 100 µl das amostras absorvidas, dos controlos e do calibrador *cut-off* para os micropoços respectivos. Cobriu-se a placa e incubou-se a 37°C, durante 30 minutos. Os anticorpos séricos da classe IgM, se presentes, ligam-se ao antígeno VCA (a gp125) que reveste a superfície de polistireno dos micropoços. O soro residual foi aspirado e os micropoços lavados por 6 vezes com tampão de lavagem. Pipetou-se 100 µl de conjugado (IgM anti-humana combinada com a enzima peroxidase) a cada poço. Cobriu-se a placa e incubou-se a 37 °C, durante 30 minutos. Repetiu-se o procedimento de lavagens e de seguida adicionou-se 100 µl de tetrametilbenzidina (TMB), o substrato da enzima peroxidase, a cada poço da microplaca e incubou-se à TA, durante 10 minutos. O substrato é hidrolisado pela enzima e o cromogénio fica azul. A reacção é interrompida pela adição de 100 µl da solução de paragem a cada poço e, paralelamente, ocorre uma viragem da cor azul para amarelo. O desenvolvimento de cor amarela é indicativo da presença de anticorpos VCA IgM na amostra testada. A leitura das absorvâncias foi feita no aparelho ELISA Processor II

(DADE Behring, Liederbach, Alemanha) num comprimento de onda de 450 nm com filtro de referência de 600-650 nm até 30 minutos após o final da reacção.

b. Pesquisa dos anticorpos IgM para o antígeno nuclear 1 (EBNA-1) do EBV

A pesquisa qualitativa dos anticorpos IgM para o antígeno nuclear 1 (EBNA-1) do EBV foi efectuada utilizando o sistema comercial *Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) IgM ELISA* (PanBio, Windsor, Austrália), de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos EBNA IgM são detectados 3 a 6 dias após o início dos sintomas, aparecendo muitas vezes antes dos anticorpos VCA IgM. Os títulos dos anticorpos EBNA IgM são usualmente superiores aos níveis dos VCA IgM apesar de ambos desaparecerem no final da fase aguda.

O procedimento experimental usado foi idêntico ao descrito para o *kit Epstein-Barr Virus viral capsid antigen (VCA) IgM ELISA*, diferindo somente nos reagentes específicos à determinação dos anticorpos em questão.

c. Detecção dos anticorpos IgG para o antígeno viral da cápside (VCA) do EBV

Na detecção qualitativa dos anticorpos IgG, para o VCA, empregou-se o *Epstein-Barr Virus viral capsid antigen (VCA) IgG ELISA* (PanBio, Windsor, Austrália). Os anticorpos IgG para o VCA são produzidos 4-7 dias após o aparecimento da sintomatologia clínica, atingem um pico, passado 2 a 4 semanas e geralmente persistem por toda a vida. Como resultado, a detecção dos VCA IgG pode indicar uma infecção aguda, convalescente ou passada.

Previamente ao início do ensaio foi certificado que todos os reagentes se encontravam à TA, 20-25°C. Principiou-se pela diluição do controlo negativo, do controlo positivo, do calibrador *cut-off* em triplicado e das amostras. Assim, a 10 µl de soro adicionaram-se 90 µl do diluente de soro, agitando-se no vórtex e aplicaram-se 100 µl da amostra absorvida, dos controlos e do calibrador *cut-off* aos micropoços respectivos. Tapou-se a placa e incubou-se a 37°C, durante 30 minutos. Os anticorpos séricos da classe IgG, se presentes,

ligam-se ao antígeno VCA (a gp125) que reveste a superfície de polistireno dos micropoços. Findo este tempo, o soro excedente foi rejeitado e os poços lavados por 6 vezes com tampão de lavagem. Seguidamente, adicionaram-se 100 µl de conjugado (IgG anti-humana combinada com a enzima peroxidase) a cada poço, cobrindo-se a placa e incubando-se 37 °C, durante 30 minutos. Lavou-se novamente a placa nas condições supramencionadas e adicionaram-se 100 µl de TMB, o substrato da enzima peroxidase, a cada poço da microplaca. Posteriormente, procedeu-se a uma incubação à TA, durante 10 minutos para que o substrato fosse hidrolisado pela enzima levando ao desenvolvimento de uma cor azul. A reacção é interrompida pela adição de 100 µl da solução de paragem a cada poço com conversão da cor azul para amarelo. O desenvolvimento da cor amarela é indicativo da presença de anticorpos VCA IgG na amostra testada. A leitura da absorvância foi feita num aparelho ELISA Processor II (DADE Behring, Liederbach, Alemanha) num comprimento de onda de 450 nm com filtro de referência de 600-650 nm no espaço de 30 minutos, após o término da reacção.

d. Determinação dos anticorpos IgG para o antígeno nuclear 1 (EBNA-1) do EBV

Na determinação qualitativa dos anticorpos IgG para o EBNA-1 usou-se o *Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) IgG ELISA* (PanBio, Windsor, Austrália). Os anticorpos EBNA IgG aparecem 2 a 4 meses após a infecção e marcam geralmente a transição da fase aguda para a fase de convalescença. Atingem o nível máximo 3-12 meses após a infecção, diminuindo de seguida, mas permanecendo detectáveis durante toda a vida. Em doentes gravemente imunocomprometidos, como doentes com SIDA e transplantados, os anticorpos EBNA IgG podem descer a níveis muito baixos ou mesmo não detectáveis em resposta ao aumento da replicação do EBV. A detecção destas imunoglobulinas indica uma infecção passada ou uma infecção resolvida.

A metodologia seguida foi análoga à relatada para o *Epstein-Barr Virus viral capsid antigen (VCA) IgG ELISA*, diferindo somente nos reagentes específicos à determinação dos anticorpos em questão.

e. Pesquisa dos anticorpos IgG para o antígeno precoce difuso (EA-D) do EBV

A pesquisa qualitativa dos anticorpos IgG para o antígeno precoce difuso (EA-D) do EBV foi efectuada utilizando o sistema comercial *Epstein-Barr virus early antigen diffuse (EA-D) IgG ELISA* (PanBio, Windsor, Austrália), de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos EA-D IgG aumentam durante a fase aguda, atingindo um pico entre a 3 e a 4 semana, e são raramente detectados 6 meses após a fase aguda. Aproximadamente 60 a 80% dos pacientes com infecção activa produzem-nos. A presença destas imunoglobinas indica uma infecção aguda, uma infecção crónica ou uma reactivação. Contudo, em 20% dos indivíduos saudáveis, este anticorpo persiste durante alguns anos. O procedimento experimental usado foi idêntico ao descrito para o *kit Epstein-Barr Virus viral capsid antigen (VCA) IgG ELISA*, divergindo somente nos reagentes exclusivos à detecção dos anticorpos em causa.

f. Detecção dos anticorpos IgG para o antígeno viral da cápside-p18 (VCA-p18) do EBV

Na detecção qualitativa dos anticorpos IgG para o antígeno viral da cápside-p18 (VCA-p18) do EBV empregou-se o *Epstein-Barr Virus viral capsid-p18 antigen (VCA-p18) IgG ELISA* (PanBio, Windsor, Austrália). A proteína VCA-p18, um pequeno antígeno da cápside, é altamente imunogénica em humanos. Os anticorpos VCA IgG são sintetizados 4-7 dias após o aparecimento dos sintomas e usualmente persistem para toda a vida. Consequentemente, a detecção do VCA IgG pode indicar uma infecção aguda, convalescente ou passada.

A metodologia seguida foi análoga à descrita para o *Epstein-Barr Virus viral capsid antigen (VCA) IgG ELISA*, diferindo somente nos reagentes específicos à determinação dos anticorpos em questão.

g. Determinação dos resultados obtidos nas pesquisas serológicas

Seguindo as instruções dos *kits*, os resultados foram calculados e expressos na grandeza indicada – unidades Panbio. Assim, considerou-se uma amostra negativa quando o valor das unidades Panbio era inferior a 9; um ensaio foi considerado positivo, quando o valor das unidades Panbio era superior a 11 e para valores intermédios o resultado era duvidoso e a análise serológica dessa amostra para o anticorpo em questão foi repetida. O cálculo das unidades Panbio foi efectuado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Unidades Panbio} = 10 \times \frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Média das absorvâncias do cut-off}}$$

3.4. Extracção e purificação de DNA viral proveniente de saliva

Na extracção e purificação do DNA viral a partir de saliva foi utilizado o *QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Barcelona, Espanha). Este sistema, para além de ser um método prático e rápido, garante, devido à selectividade apresentada pela resina, a obtenção de um DNA com um elevado grau de pureza, ideal para ser usado em técnicas mais sensíveis, como é o caso da amplificação por PCR e o *Southern blotting*. Este procedimento, baseia-se na lise enzimática com proteínase K das células presentes na amostra, seguida de adsorção do DNA a uma matriz de gel de sílica (presente na coluna “QIAamp spin”) e subsequente eluição do DNA.

Seguindo as instruções do fabricante, colocaram-se num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml 20 µl de proteínase K, 200 µl da amostra e 200 µl da solução de lise AL, agitando-se no vórtex, durante 15 segundos. A mistura foi incubada a 56°C, durante 10 minutos, o que promove o aumento do rendimento de extracção do DNA. Posteriormente, adicionaram-se 200 µl de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) e agitando-se no vórtex. A mistura final foi aplicada à coluna seguida de uma centrifugação (Centrifuge 5415C, Eppendorf) a 8000 rpm, durante 1 minuto. Rejeitou-se o filtrado e lavou-se a coluna com 500 µl da solução AW1, seguida de uma centrifugação a 8000 rpm, durante 1 minuto, de forma a remover o tampão de lavagem. Desprezou-se tanto o fluido recolhido como o tubo

colector. Uma segunda lavagem foi efectuada aplicando à coluna 500 µl da solução de lavagem AW2 e centrifugando-se a 14 000 rpm, durante 3 minutos. Por fim, a coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e para a eluição dos ácidos nucleicos aplicou-se 50 µl da solução AE. Após 5 minutos, centrifugou-se a 8000 rpm, durante 1 minuto. Fez-se uma segunda eluição repetindo o procedimento, visto que, duas eluições amplificam o rendimento da recuperação dos ácidos nucleicos virais. O DNA foi conservado a -20°C para posterior amplificação.

3.5. Extracção e purificação de DNA viral procedente de soro sanguíneo

O DNA viral foi extraído e purificado de soro sanguíneo utilizando o *QIAamp® Ultrasens™ Virus Kit* (QIAGEN, Barcelona, Espanha). Este *kit* permite uma recuperação rápida, eficiente e bastante sensível de DNA e RNA viral de amostras de soro e plasma. Possibilita uma boa concentração dos ácidos nucleicos virais existentes nas amostras, permitindo uma detecção de baixas concentrações virais. Contaminantes e inibidores enzimáticos são eficientemente removidos pelo procedimento de purificação usado, que se baseia na adsorção dos ácidos nucleicos a uma coluna com matriz de gel de sílica sem recurso à utilização de fenol, clorofórmio ou outros solventes orgânicos.

Foi pipetado 1 ml de soro, previamente equilibrado à TA, para um tubo de microcentrífuga de 2 ml. Seguidamente, adicionaram-se no topo da amostra 0,8 ml da solução AC, reagente que lisa as células existentes na amostra, inactiva as Rnases e precipita os ácidos nucleicos e 5,6 µl da solução de RNA transportador. Misturou-se a solução invertendo o microtubo três vezes e agitando no vórtex, durante 10 segundos. A suspensão foi incubada à TA, durante 10 minutos e depois centrifugada (Centrifuge 5415D, Eppendorf) a 1200x g, durante 3 minutos, recolhendo-se o sedimento que contém os ácidos nucleicos complexados. O sedimento foi ressuspenso em 300 µl da solução AR (equilibrada a 60°C) e em 20 µl de proteínase K e, incubado a 40°C, durante 10 minutos para digestão das proteínas existentes na amostra. À mistura anterior acrescentou-se 300 µl da solução AB, reagente que promove a ligação dos ácidos nucleicos à matriz de gel de sílica. Os 700 µl do lisado foram aplicados à coluna, seguindo-se uma centrifugação a 3000– 5000x g, durante 1 minuto. Rejeitou-se o filtrado e adicionou-se à coluna 500 µl da

solução de lavagem AW1. Centrifugou-se a 6000x g, durante 1 minuto, e uma segunda lavagem da coluna foi efectuada com 500 µl da solução de lavagem AW2. Centrifugou-se à velocidade máxima, durante 3 minutos, para total remoção do tampão de lavagem colocando-se a coluna num novo microtubo de 1,5 ml. Os ácidos nucleicos foram eluidos aplicando no centro da coluna, 30 µl da solução AVE e centrifugando a 6000x g, durante 1 minuto. Uma segunda eluição foi realizada uma vez que, duas eluições aumentam o rendimento da recolha dos ácidos nucleicos virais. O DNA foi preservado a -20°C para futura utilização na PCR em tempo real.

3.6. Extracção e purificação de DNA viral em biopsias (endoscópicas e cirúrgicas) gástricas congeladas

O DNA viral foi extraído e purificado a partir de tecidos gástricos usando o sistema comercial *QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Barcelona, Espanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Do tecido em questão, foi cortado um fragmento, com aproximadamente 25 mg, que foi finamente fragmentado com auxílio de um bisturi. Colocou-se a amostra num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e adicionou-se 180 µl do tampão ATL e 20 µl de proteínase K, agitou-se no vórtex e incubou-se a 56°C, durante a noite, num banho (GFL) com agitação. Seguidamente, pipetou-se para a mistura anterior 200 µl do tampão AL, agitou-se durante 15 segundos no vórtex e incubou-se a 70°C num banho (GFL) termostatizado, durante 10 minutos. Adicionou-se 200 µl de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) e agitou-se no vórtex. A mistura final foi aplicada à coluna, seguida de uma centrifugação (Centrifuge 5415C, Eppendorf) a 8000 rpm, durante 1 minuto, para adsorção do DNA à membrana de gel de sílica. As lavagens da coluna para remoção dos contaminantes presentes na amostra e a eluição do DNA foram efectuadas como o descrito em 3.4.. O DNA foi conservado a -20°C para posteriores aplicações.

3.7. Extracção e purificação de DNA viral em biopsias gástricas incluídas em parafina

O DNA viral foi extraído e purificado de tecidos gástricos incluídos em parafina através do kit *QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Barcelona, Espanha), seguindo as instruções do fabricante. Este protocolo consiste na desparafinação do tecido e posterior processamento de acordo com o procedimento experimental seguido para os tecidos congelados. Assim, foi seccionado do bloco de parafina, um corte com aproximadamente 25 mg, tentando minimizar a quantidade de parafina envolvente excisada com o fragmento. O corte foi colocado num tubo de microcentrífuga de 2 ml e adicionou-se 1200 µl de xileno (Panreac Química, Barcelona, Espanha), agitou-se vigorosamente no vórtex e, seguiu-se uma centrifugação (Centrifuge 5415C, Eppendorf) à velocidade máxima, durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido por aspiração e ao sedimento acrescentou-se 1200 µl de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) de forma a remover o xileno residual. Agitou-se suavemente no vórtex e centrifugou-se nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente removido por aspiração e repetiu-se os passos de adição e remoção do etanol; para uma completa evaporação do etanol colocou-se o microtubo aberto numa estufa (Heraeus) termostaticada a 37°C, durante 15 minutos. Terminado o procedimento experimental que visou a eliminação da parafina prosseguiu-se com o protocolo de extracção e purificação de DNA a partir de tecidos (descrito em 3.6.).

3.8. Quantificação de DNA

A concentração do DNA viral foi estimada por leitura automática no aparelho GeneQuan pro (Biochrom, Cambridge, Inglaterra) nos comprimentos de onda compreendidos entre 260 e 280 nm. Na determinação aplicaram-se 7 µl da amostra a uma “cuvette” de ultramicrovolume. A leitura a 260 nm, permite o cálculo da concentração de ácidos nucleicos presentes na amostra, tendo em conta que, uma unidade de absorvância corresponde a uma concentração de 50 µg/ml para DNA de cadeia dupla. A pureza das

amostras foi estimada pela leitura das mesmas a 280 nm e calculada a razão (DO_{260} / DO_{280}). Preparações puras de DNA devem apresentar valores entre 1,7 e 1,9.

3.9. Detecção e quantificação do DNA viral nas diversas amostras por PCR em tempo real

A PCR em tempo real é um método quantitativo para medição de DNA que usa *primers* específicos para uma sequência do gene *BALF5* e uma sonda – “TaqMan” marcada na extremidade 5' com um fluorocromo (*reporter*) e na extremidade 3' com uma molécula que absorve, mas que não emite fluorescência o “quencher”. Se a sequência alvo está presente, a sonda liga-se especificamente entre o *primer forward* e o *primer reverse* e, durante a amplificação a “AmpliTaq Gold DNA polimerase” cliva a sonda entre o “reporter” e o “quencher” provocando a separação destas moléculas e consequente aumento da emissão de fluorescência pelo repórter. A intensidade de fluorescência aumenta em proporção directa com a quantidade de produtos amplificados e ciclo a ciclo as mudanças são quantificadas.

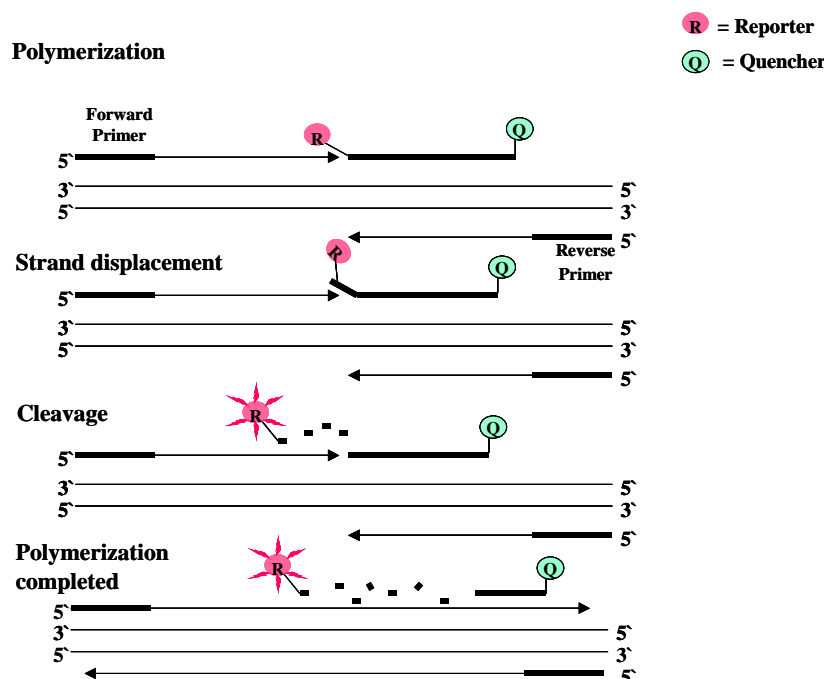


Figura 7– Ilustração da PCR em tempo real realizada com a sonda “TaqMan” (adaptado de “Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents- Gene Expression Quantification”, Applied Biosystems, 2001).

Os resultados são registados durante a fase exponencial da reacção quando a emissão de fluorescência é proporcional ao número de cópias presentes. Contudo, quando a sonda se encontra intacta a proximidade do “reporter” e do “quencher” faz com que o “quencher” neutralize a fluorescência emitida pelo “reporter” e, consequentemente nenhum sinal é detectado. Para além disso, a extremidade 3' da sonda encontra-se bloqueada para prevenir a extensão da sonda durante a PCR. Uma vez que, as sondas fluorogénicas só emitem sinal fluorescente quando hibridizam com o alvo, amplificações inespecíficas originadas por *mispriming* ou dímeros de *primers* não são detectadas.

a. Condições usadas na PCR em tempo real

(Adaptado de Kimura *et al.*, 1999).

Os *primers* utilizados amplificam uma região do gene *BALF5* que codifica para a DNA polimerase viral e foram sintetizados pela MWG-Biotech, AG, Ebersberg, Alemanha.

Tabela II – Sequências dos “*primers*” e da sonda utilizados na PCR em tempo real.

Primers	Sequência
“Forward”	5'-CGG AAG CCC TCT GGA CTT C-3'
“Reverse”	5'-CCC TGT TTA TCC GAT GGA ATG-3'
“Sonda”	5'- FAM-TGT ACA CGC ACG AGA AAT GCG CC-TAMRA-3'

As reacções de PCR foram executadas utilizando o *kit* “TaqMan® Universal PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, EUA) num volume final de 50 µl. A mistura para cada reacção de amplificação compreendia: 25 µl de Universal PCR Master Mix, 5 µl de cada *primer* ambos numa concentração de 9,0 µM, 5 µl da sonda a 2,5 µM e 5 µl de água livre de RNases e DNases (Promega, Madison, EUA). Em cada poço de uma microplaca de 96 poços – “96– well Optical Reaction Plate” (Applied Biosystems, Foster City, EUA) colocaram-se 45 µl da mistura anterior e 5 µl do DNA a amplificar. Uma vez que cada reacção de amplificação foi executada em duplicado, por placa amplificaram-se simultaneamente 40 amostras, isto porque, em cada ensaio usou-se como controlo positivo 7 diluições (10^6 - 10^0) do DNA viral extraído da linha celular infectada com o EBV (B95-8)

e um controlo negativo com água livre de nucleases, para exclusão de possíveis contaminações. A placa foi então coberta com uma película adesiva –“Adhesive Cover” (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e colocada no ABI PRISM 7900 HT dando-se início à reacção de amplificação. O programa de PCR usado consistiu primeiro numa incubação a 95°C, durante 10 minutos, para activação da enzima “AmpliTaq Gold” (Applied Biosystems, Foster City, EUA), seguido de 50 ciclos com o seguinte perfil térmico: 95°C, durante 15 segundos, para desnaturação do DNA de cadeia dupla e 60°C, durante 1 minuto, para emparelhamento dos *primers* e extensão das cadeias. O sinal de fluorescência é lido no final do segundo passo.

Os resultados obtidos na PCR em tempo real são visualizados num gráfico que exhibe a variação do sinal de fluorescência em função do número de ciclos. Um aumento na fluorescência acima do limiar definido (“threshold”) determina a detecção dos produtos amplificados. A fluorescência “threshold” foi definida como sendo o ponto onde o sinal fluorescente equivale a 10 vezes o desvio padrão da fluorescência de fundo. O parâmetro Ct (“threshold cycle”) corresponde normalmente ao número de ciclos em que a curva de amplificação de uma dada amostra atravessa o “threshold”. Os valores de Ct foram calculados para cada amostra e as diluições do DNA obtido a partir da linha celular B95-8 foram usadas para construir a curva padrão. A curva obtida deverá ser uma recta quando tem como ordenada o \log_{10} do número inicial de cópias e em abcissa os valores de Ct, (Leung *et al.*, 2002). O valor de Ct é a unidade de medida preferida para quantificar o número de cópias, uma vez que, é mais exacto do que uma medição efectuada no final da reacção de amplificação visto que, o Ct é detectado pelo aparelho quando a reacção de amplificação ainda se encontra na fase exponencial e nessa etapa, nenhum dos componentes da reacção é factor limitante (Leung *et al.*, 2002).

A quantificação do EBV em amostras desconhecidas foi efectuada extrapolando os respectivos valores de Ct na curva padrão. O *software* do equipamento efectua todo o processo de cálculo desde os valores de Ct, bem como a execução da curva padrão e ainda a determinação do número de cópias de DNA viral presente em cada uma das amostras. Quanto maior for a quantidade de DNA viral, mais rapidamente será detectado o produto amplificado e menor será o seu valor de Ct. As amostras foram consideradas positivas quando o número de cópias de DNA viral por célula foi superior a 5, uma vez que a linha celular usada para controlo positivo possui 5 cópias do genoma viral por célula.

3.10. Linha celular B95-8

A linha celular B95-8 foi gentilmente cedida pelo Prof. Emmanuel Drouet, Universidade Joseph-Fourier, Grenoble, França.

O DNA da linha celular B95-8 foi extraído e purificado usando o sistema comercial *QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Barcelona, Espanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Num tubo de microcentrifuga de 1,5 ml colocou-se uma concentração de 2×10^5 células/ml e, centrifugou-se (Centrifuge 5415D, Eppendorf) a 300x g, durante 5 minutos. No final, o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi ressuspensão em PBS (Gibco, Paisley, Escócia, UK) até perfazer um volume final de 200 µl. De seguida, acrescentou-se 20 µl de proteinase K e 200 µl do tampão AL agitando-se no vórtex durante 15 segundos. A mistura foi incubada a 56°C, durante 10 minutos e, posteriormente, adicionou-se 200 µl de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha). A mistura final foi aplicada à coluna seguida de uma centrifugação (Centrifuge 5415D, Eppendorf) a 8000 rpm, durante 1 minuto, no final desta rejeitou-se o filtrado. As lavagens efectuadas à coluna para remoção dos contaminantes presentes na amostra e a eluição do DNA foram executadas como o descrito em 3.4.. O DNA foi conservado a -20°C para futuras utilizações. Os tampões referidos foram fornecidos pelo sistema comercial.

3.11. Medição da apoptose em biopsias gástricas congeladas

Para a quantificação da apoptose em biopsias gástricas foi usado o *APO-BRDUTM KIT* (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

A apoptose é o termo que descreve a morte celular programada ou regulada. É um evento característico que desencadeia alterações morfológicas e biológicas no ciclo celular culminando com a morte das células. Uma marca patognomónica da destruição celular pelo mecanismo de apoptose é a activação de endonucleases que irão degradar o DNA nuclear, entre os nucleosomas, em múltiplos fragmentos com um tamanho aproximado de 200 pb. Uma particularidade deste evento é que os fragmentos obtidos possuem extremidades 3'-hidroxil, característica que foi aproveitada pelo *kit* em questão para a

identificação das células apoptóticas através da marcação dos terminais 3'-hidroxil com nucleótidos de bromodeoxiuridina trifosfatada (Br-dUTP). Sendo a enzima transferase deoxinucleotidil terminal (TdT) responsável pela adição dos deoxiribonucleotidos trifosfatados aos terminais 3'-hidroxil. Uma vez que, estes terminais só estão disponíveis em número considerável nas células apoptóticas, as células não apoptóticas não incorporam quantidades significativas de Br-dUTP. Após a incorporação estes terminais, são identificados por coloração das células com um anticorpo monoclonal anti-BrdU conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). O *APO-BRDUTM KIT* é um sistema de marcação com duas fluorescências que assinala o DNA fragmentado e o DNA celular total.

As biopsias gástricas foram descongeladas e desagregadas mecanicamente com auxílio de um bisturi. Antes de se proceder à coloração das células é necessário fixá-las para evitar a perda do DNA antes ou durante o processo de marcação. Assim, foi feita, sempre que possível, uma suspensão celular de concentração $1-2 \times 10^6$ células/ml numa solução de paraformaldeído (Sigma, Steinheim, Alemanha) a 1% (p/v) em PBS (Gibco, Paisley, Escócia, UK), que foi colocada em gelo, durante 60 minutos, para permitir a fixação do DNA às proteínas intracelulares. De seguida, as células foram centrifugadas (Sigma 302K) a 300x g, durante 5 minutos, rejeitando-se o sobrenadante. Para completa remoção do fixador, o sedimento celular foi lavado por 2 vezes com 5 ml de PBS. As células foram recuperadas por centrifugação (Sigma 302K) e a sua concentração foi ajustada a $1-2 \times 10^6$ células/ml em etanol gelado (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 70% (v/v). Após uma incubação em gelo, no mínimo durante 30 minutos, as suspensões celulares foram preservadas a -20°C até se efectuarem as marcações com a Br-dUTP.

Em cada ensaio de marcação celular foi processado conjuntamente com as amostras um controlo positivo e um controlo negativo, ambos fornecidos pelo *kit*. Foi retirado 1 ml (aproximadamente 1×10^6 células/ml) de cada controlo e, quer os controlos quer as amostras, foram colocados em tubos de 12x75 mm e centrifugados (Heraeus Christ Labofuge^{GL}) a 300x g, durante 5 minutos. O etanol foi removido por aspiração e o sedimento celular foi ressuspenso em 1 ml do tampão de lavagem, por agitação, no vórtex. Centrifugou-se nas mesmas condições e o sobrenadante foi retirado por aspiração. O passo de lavagem foi repetido e ao sedimento adicionou-se 50 µl da solução de marcação do DNA, preparada de acordo com o protocolo do *APO-BRDUTM KIT*. Seguiu-se uma

incubação num banho (GFL) termostatzado a 37°C, durante 60 minutos, em que, a cada 15 minutos de incubação agitaram-se no vórtex as suspensões celulares. Findo este tempo, adicionou-se a cada tubo 1 ml do tampão *rinse*, centrifugou-se (Heraeus Christ Labofuge^{GL}) a 300x g, durante 5 minutos e, removeu-se o sobrenadante por aspiração. Repetiu-se o passo anterior e ressuspendeu-se o sedimento em 100 µl da solução de marcação do anticorpo, anticorpo anti-BrdU marcado com FITC (preparada segundo as instruções do *kit*). Seguiu-se uma incubação à TA, no escuro, durante 30 minutos, no final da qual se pipetou para cada tubo 500 µl da solução de Iodeto de propídeo /Rnase, que irá marcar unicamente o DNA uma vez que, a Rnase degrada o RNA. Por fim, uma última incubação foi efectuada à TA, no escuro, durante 30 minutos. As suspensões celulares foram analisadas por citometria de fluxo (Coulter EPICS® XL, Beckman Coulter, Fullerton, EUA) usando o programa de aquisição Coulter System IITM Version 3,0 (Beckman Coulter, Fullerton, EUA). Sempre que possível, foram adquiridos 10000 eventos e o fluxo celular foi mantido abaixo de 600 eventos/segundo, tendo o cuidado de eliminar os dupletos de núcleos através de uma janela de aquisição, colocada num histograma, de sinal de pico por sinal total de fluorescência para o iodeto de propídeo. A determinação da percentagem de células em apoptose e a análise do ciclo celular foram efectuados usando o *software* MultiCycleAV (Phoenix Flow systems, San Diego, EUA).

3.12. Determinação da ploidia do DNA em biopsias gástricas congeladas

Na determinação da ploidia do DNA foi usado o iodeto de propídeo, uma substância que se liga de uma forma específica e estequiométrica ao DNA com o objectivo de quantificar variações no índice total do DNA nuclear. Assim, poderá comprovar-se a existência de células com conteúdos de DNA anormais (aneuploidia) e também observar a distribuição da população analisada pelas diferentes fases do ciclo celular (fase G₀+G₁, fase-S e fase G₂+M). Este tipo de estudo baseia-se na identificação de dois grandes grupos de células, o pico de DNA G₀/G₁ que representa as células em estado quiescente (G₀) ou na fase de pré-síntese (G₁). O segundo pico de DNA, o G₂/M, que representa células em elevada síntese proteica (G₂) ou células em divisão (M) e que, corresponde à fracção celular que possui o dobro da quantidade de DNA que os eventos em G₀/G₁, uma vez que,

surge após a fase de síntese de DNA (fase S). A percentagem de células em cada fase do ciclo celular é calculada por modelos matemáticos incluídos no *software* do equipamento.

As biopsias foram descongeladas e desagregadas mecanicamente com auxílio de um bisturi. Sempre que possível a concentração foi ajustada 1×10^6 núcleos/ml em PBS (Gibco, Paisley, Escócia, UK). A suspensão nuclear foi centrifugada (Heraeus Christ Labofuge^{GL}) 300x g durante 5 minutos e o sobrenadante rejeitado. O sedimento foi ressuspensionado em 1 ml de uma solução de iodeto de propídeo (*Cyclo-Scope* - Cytognos, Salamanca, Espanha) e incubado à TA, no escuro, durante 10 minutos, em posição horizontal. A aquisição foi feita num Coulter EPICS® XL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA) usando o *software* Coulter System IITM Version 3,0 (Beckman Coulter, Fullerton, EUA). Se as amostras não forem adquiridas após a marcação, devem ser conservadas no frio, 4°C, sem contudo exceder as 3 horas após a marcação. Sempre que possível, foram adquiridos 10000 eventos e o fluxo celular foi mantido abaixo de 600 eventos/segundo, tendo o cuidado de eliminar os dupletos de núcleos através de uma janela de aquisição, colocada num histograma, de sinal de pico por sinal total de fluorescência para o iodeto de propídeo. A determinação do índice de DNA (DI) e a análise do ciclo celular foram efectuados usando o *software* MultiCycleAV (Phoenix Flow systems, San Diego, EUA).

3.13. Determinação da ploidia do DNA em biopsias gástricas incluídas em parafina

(Adaptado de Hedley *et al.*, 1983)

Do bloco de parafina efectuaram-se cortes com o auxílio de um bisturi, tentando minimizar a quantidade de parafina envolvente excisada com o fragmento histológico. Os cortes foram colocados num tubo de vidro com 1 a 2 ml de xileno (Panreac Química, Barcelona, Espanha) durante 10 minutos. Depois foram transferidos para um tubo com etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) até que todo o xileno fosse removido. De seguida foram hidratados com uma série decrescente de soluções alcoólicas (100%, 95%, 70%, 50%) durante 10 minutos em cada. Posteriormente, foi feita uma lavagem com água destilada durante 10 minutos e, findo este tempo, o material histológico foi desagregado mecanicamente com auxílio de um bisturi para facilitar a digestão enzimática que se segue.

Assim, o tecido foi colocado num tubo de vidro e incubado a 37°C com 2 ml de uma solução de pepsina (Sigma, Steinheim, Alemanha) a 0,5% com pH de 1,5, durante 30 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. Deixou-se os fragmentos maiores sedimentarem e retirou-se o sobrenadante que foi centrifugado (Heraeus Christ Labofuge^{GL}) a 2000 rpm, durante 10 minutos. O sedimento foi lavado com PBS (Gibco, Paisley, Escócia, UK) e depois ressuspensionado em 1 ml de uma solução de iodeto de propídeo (*Cyclo-Scope* - Cytognos, Salamanca, Espanha) com a concentração ajustada a 1×10^6 núcleos/ml. A solução foi incubada à TA, no escuro, durante 10 minutos, em posição horizontal. A aquisição foi feita num Coulter EPICS® XL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA) usando o programa de aquisição Coulter System IITM Version 3,0 (Beckman Coulter, Fullerton, EUA). Se as amostras não forem adquiridas após a marcação devem ser conservadas no frio, 4°C, sem contudo exceder as 3 horas após a marcação. Sempre que possível, foram adquiridos 10000 eventos e o fluxo celular foi mantido abaixo de 600 eventos/segundo, tendo o cuidado de eliminar os dupletos de núcleos através de uma janela de aquisição, colocada num histograma, de sinal de pico por sinal total de fluorescência para o iodeto de propídeo. A determinação do DI e a análise do ciclo celular foram efectuados usando o *software* MultiCycleAV (Phoenix Flow systems, San Diego, EUA).

Solução de pepsina a 0,5%: Pepsina a 0,5% (Sigma, Steinheim, Alemanha); Cloreto de sódio a 0,9% (Merck, Darmstadt, Alemanha), pH 1,5 – ajustado com ácido clorídrico a 37% (Pronalab, Lisboa, Portugal).

3.14. Análise dos histogramas obtidos na determinação da ploidia do DNA em biopsias gástricas

Os histogramas de DNA foram obtidos a partir de biopsias gástricas tumorais e das respectivas mucosas normais. Na análise dos resultados, quando observado um pico G₀/G₁, a amostra foi considerada diplóide; se foi detectado mais do que um pico foi tida como aneuplóide e para controlo da localização do pico diplóide, foi utilizado sangue de um indivíduo saudável, assim como, as mucosas gástricas normais. O DI, definido como sendo a razão do pico G₀/G₁ da população aneuplóide, sobre o pico G₀/G₁ da população diplóide,

é igual a 1 para amostras diplóides e diferente de 1 para aneuplóides, salientando-se que populações tetraplóides apresentam um DI entre 1,95 e 2,05.

4. RESULTADOS

4.1. Análise anatomopatológica do tumor

O sistema mais vulgarmente usado para o estágio dos carcinomas gástricos é a classificação TNM, que é baseada no estágio patológico pós gastrectomia. A tabela VII, em anexo, apresenta a definição da classificação TNM e do tipo histológico, segundo o *American Joint Committee on Cancer* (2002).

Pela observação da tabela III, pode-se constatar que 40% dos carcinomas gástricos positivos para o EBV localizavam-se no estômago, 20% encontravam-se no antro, 10% estavam circunscritos à pequena curvatura, e igual percentagem situavam-se no piloro, no fundo e no cárdia. Nos CG EBV negativo 41,4% encontravam-se no antro, 17,2% situavam-se no estômago, 13,8% localizavam-se na grande curvatura, 6,9% estavam delimitados ao cárdia, outros 6,9% ao corpo, 3,45% encontravam-se na pequena curvatura e no fundo e em 6,9% não foi possível determinar a localização.

Quanto à classificação do tumor primário (T) nos CG EBV positivo, 50% foram definidos como T2, 20% como T3 e 30% dos tumores primários não foram classificáveis. Nos CG EBV negativo 17,2% foram classificados de T1, 31% de T2, 34,5% de T3, 3,5% de T4 e em 13,8% não foi possível instituir classificação.

Considerando o estudo dos gânglios linfáticos regionais (N) verifica-se que em 10% dos CG EBV positivo não foram encontradas metástases nos gânglios linfáticos regionais (N0); todavia em 50% dos casos foram detectadas metástases, em que a 40% foi atribuído N1 e a 10% N3, nos restantes 40% dos CG EBV positivo não foi possível determinar a existência ou não de metástases (Nx). Nos CG EBV negativo observa-se uma maior percentagem de indivíduos sem metástases nos gânglios linfáticos regionais (34,5%) do que nos CG EBV positivo, contudo a proporção de pacientes com metástases é muito semelhante, 51,8%, em que a 27,6% dos casos foi atribuído N1, a 20,7% N2 e a 3,5% N3; em 13,8% não foi possível definir a existência de metástases (Nx).

A investigação de metástases distantes (M) do tumor primário mostra que em grande parte dos CG, 72,4% dos CG EBV negativos e 70% dos CG EBV positivo, não foi viável a estimação deste parâmetro (Mx). Contudo verifica-se também que, respectivamente, 20% e 6,9% dos CG EBV positivo e EBV negativo não apresentam metástases distantes (M0), mas em 10% dos CG EBV positivo e em 20,7% dos CG EBV negativo foram detectadas metástases distantes ao tumor primário (M1).

Tabela III– *Relação entre a classificação anatomopatológica e a detecção do genoma do EBV nos tumores gástricos.*

Paciente Nº	Localização	T	N	M	Estádio	G	Histologia	Nº de cópias do DNA do EBV
1						X	I	-
2	A			1	IV	2	I	-
3	PC	1	0	X	IA	1	I	-
4		3	2	1	IV	3	D	-
5	P	2		0		3	Ms	13
6	A	2	1	X	II	3	I	-
7	F	3	2	X	IIIB	X	I	-
8	A	2	1	X	II	X	D	-
9	A	4	2	1	IV	3	I	-
10	A	3	2	1	IV	X	D	-
11	A	2	1	X	II	3	I	-
12	E	1	0	X	IA	2	I	-
13	Co	2	0	X	IB	2	I	-
14	A	2	0	X	IB	3	I	-
15	A			1	IV	1	I	64
16	E					2	I	6205
17	PC	2	0	X	IB	2	I	10877
18	C	2	0	X	IB	X	I	-
19	GC	2	1	X	II	X	D	-
20	E	3	2	0	IIIB	2	D	-
21	E	2	1	X	II	X	D	18
22	E	3	1	0	IIIA	1	I	49
23	E	2	0	X	IB	3	D	-
24	A	3	3	1	IV	2	I	-
25	A					X	I	9
26	GC	1	0	X	IA	2	I	-
27	GC	1	0	X	IA	2	D	-
28	E	3	1	X	IIIA	X	D	-
29	Co					1	End	-
30	A	1	0	X	IA	X	CGI Ms	-
31	E	2	1	X	II	3	I	18
32	C	2	3	X	IV	2	D	7
33	GC						GIST	-
34	C	3	2	0	IIIB	1	I	-
35	E	2	0	X	IB	3	D	-
36	F	3	1	X	IIIA	X	D	20
37	A	3	1	X	IIIA	X	Ms	-
38	A	3	1	X	IIIA	X	D	-
39	A	3	1	1	IV	X	I	-

A – Antro; C – Cárdia; CGI- Carcinoma Gástrico Inicial; Co – Corpo; D – Difuso; E – Estômago; End – Endócrino; F – Fundo; G – Grau histológico; GC – Grande Curvatura; GIST – Tumor maligno do estroma gástrico; I – Intestinal; M – Metástases distantes; Ms – Misto; N – Gânglios linfáticos regionais; P – Píloro; PC – Pequena Curvatura; T – Tumor primário.

Nos CG EBV positivo, 10% foram classificados com estágio I, 20% com estágio II, igual proporção com estágio III e estágio IV e em 30% dos casos não foi possível determinar o estágio. Nos CG EBV negativo, 34,5% foram classificados com estágio I,

13,8% com estágio II, 20,7% com estágio III, igual percentagem com estágio IV, e em 10,35% não foi exequível definir estágio.

A apreciação do grau histológico (G) evidencia uma tendência semelhante entre os dois grupos de tumores gástricos, observando-se assim uma distribuição homogênea entre os vários graus histológicos.

Quanto ao tipo histológico, 60% dos CG EBV positivos foram definidos como pertencentes ao tipo intestinal, 30% ao tipo difuso e 10% ao tipo misto. Nos CG EBV negativos, 51,7% são do tipo intestinal, 34,5% do tipo difuso, 3,45% do tipo misto, igual percentagem foi definida como pertencente aos tipos endócrino, tumor maligno do estroma gástrico e CG inicial misto.

4.2. Detecção de anticorpos contra antígenos do EBV

Foram utilizados dois kits para quantificação do mesmo anticorpo (VCA-IgG), uma vez que empregam dois antígenos diferentes, a gp125 e a proteína p18, e por comparação do título dos anticorpos VCA IgG (dados não apresentados) verifica-se que o *kit* VCA (p18) IgG é mais sensível. Assim, assume-se que amostras positivas no VCA (p18) IgG e negativas no VCA (gp125) IgG sejam positivas para a detecção do referido anticorpo. Pela análise dos dados apresentados na tabela IV, verifica-se que 93,1% dos CG EBV negativo, 90% dos GC EBV positivo e 100% do grupo controlo exibem uma infecção passada. Uma reactivação da infecção é verificada em 10% dos CG EBV positivo e 6,9% dos CG EBV negativos são seronegativos para o EBV. No grupo controlo e nos CG EBV negativos, em respectivamente, 25% e 3,7% dos indivíduos com infecção passada foi encontrado um perfil serológico típico de uma infecção de latência, ou seja, só é verificada seropositividade para os anticorpos EBNA-IgG.

Tabela IV– Resultados obtidos na pesquisa dos vários anticorpos contra antígenos do EBV.

Nº de Pacientes	VCA-IgM	EBNA-IgM	VCA-IgG	EBNA-IgG	EA-IgG
25	-	-	+	+	-
5	-	-	+	-	-
4	-	-	+	+	+
2	-	-	-	-	-
1	-	-	+	-	+
1	-	+	+	+	+
1	-	-	-	+	-
Nº de controles	VCA-IgM	EBNA-IgM	VCA-IgG	EBNA-IgG	EA-IgG
2	-	-	+	+	-
1	-	-	+	+	+
1	-	-	-	+	-

A análise do gráfico (figura 8) referente ao título médio dos vários anticorpos evidencia que o grupo CG EBV positivo apresenta um título médio de anticorpos mais elevado do que os restantes grupos, com excepção para os anticorpos VCA IgM. Em termos estatísticos, foram utilizados os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para avaliar esta variação e verificou-se que havia significância ($p < 0,05$), precisamente nos anticorpos VCA IgM para as populações controlo e CG EBV positivos e também nos anticorpos VCA (p18) IgG para os mesmos grupos.

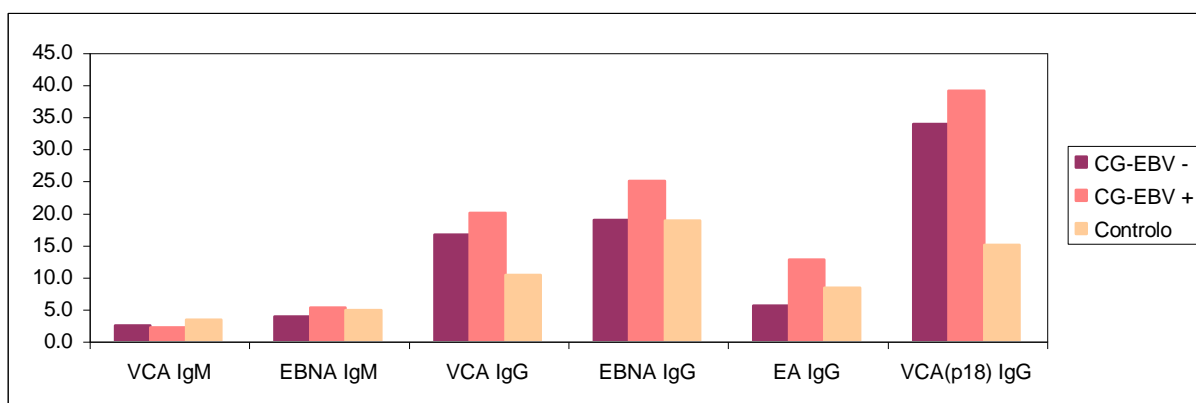


Figura 8– Título médio dos anticorpos VCA IgM, EBNA IgM, VCA IgG, EBNA IgG, EA IgG, VCA (p18) IgG para os grupos CG EBV negativo, CG EBV positivo e grupo controlo.

4.3. Quantificação do DNA viral nas diversas amostras por PCR em tempo real

Em 41% dos pacientes, a pesquisa do genoma viral em todas as amostras foi negativa. O DNA do EBV foi detectado em 2,56% dos soros sanguíneos, em 33,3% das salivas, em 25,6% dos carcinomas gástricos e em 23,1% das mucosas normais. Em dois doentes, o DNA viral foi encontrado simultaneamente na saliva, no tumor e na mucosa normal e três casos revelaram a presença do genoma do EBV quer na saliva quer no tumor. Verifica-se, então, que 50% dos indivíduos com CG EBV positivo excretam o vírus na saliva. Num paciente o DNA viral foi detectado no soro sanguíneo, o que sugere replicação viral no soro facto que é corroborado pelos dados obtidos na análise serológica, uma vez que foi o único caso onde se verificou uma reactivação da infecção, acrescentando ainda que, o DNA do EBV também foi detectado no respectivo tumor (tabela V).

Tabela V– *Resultados obtidos na pesquisa do DNA do EBV por PCR em tempo real nas várias amostras.*

Nº de Pacientes	Soro	Saliva	Tumor	Mucosa normal
16	-	-	-	-
7	-	+	-	-
5	-	-	-	+
3	-	-	+	-
3	-	+	+	-
2	-	+	+	+
1	+	-	+	-
1	-	-	+	+
1	-	+	-	+
Nº de controlos	Soro	Saliva	-----	Mucosa normal
3	-	-		-
1	-	+		-

No soro sanguíneo foram detectadas 24 cópias de DNA viral por μg de DNA total; na saliva foram encontradas desde 18 a 71786 cópias de DNA viral por μg de DNA total, com média de 6089 cópias de DNA viral por μg de DNA total. Nos tumores foram detectadas desde 7 a 10877 cópias de DNA viral por μg de DNA total, com média de 1728 cópias de DNA viral por μg de DNA total e nas mucosas normais a pesquisa do DNA viral revelou a presença desde 6 a 58 cópias de DNA viral por μg de DNA total, com média de 20 cópias de DNA viral por μg de DNA total.

Em 75% dos indivíduos pertencentes ao grupo controlo não foi encontrado o DNA viral, nos restantes 25% o genoma do EBV só foi detectado na saliva na quantidade de 1527 cópias de DNA viral por μg de DNA total.

Comparando os dados serológicos com os resultados auferidos na pesquisa do DNA viral verifica-se que, dos 16 casos negativos na PCR, um deles (6,25%) é confirmado pela serologia e os restantes 93,75% manifestam infecção passada. Os indivíduos em que numa ou mais amostras foi detectado DNA viral, apresentam infecção passada, com excepção, do paciente nº 16 que exhibe uma reactivação da infecção e do doente nº 24 que é seronegativo, mas que, quer na saliva quer na mucosa normal foi encontrado o genoma do EBV.

4.4. Determinação da ploidia do DNA e da apoptose

A análise do gráfico presente na figura 9 revela que 100% das mucosas normais são diplóides, enquanto que nos tumores, 32,3% são aneuplóides heterogéneos com um DI de 1,7, 6,5% são tetraplóides com um DI de 2.0 e os restantes 61,3% dos tumores são diplóides.

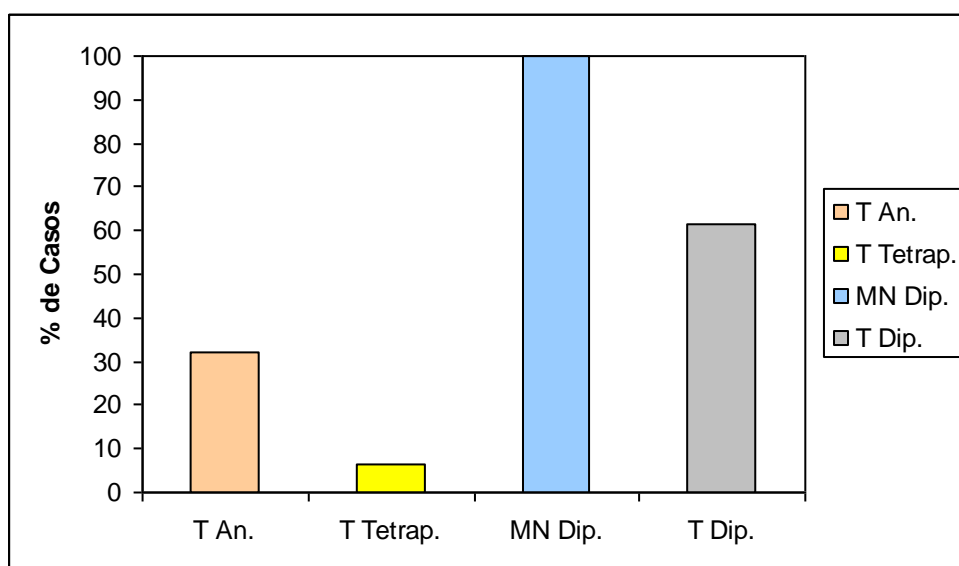


Figura 9– Distribuição da ploidia do DNA nos tumores e nas mucosas normais.

As mucosas gástricas normais, provenientes de doentes com tumores gástricos aneuplóides e com tumores gástricos diplóides, apresentam uma percentagem de células em fase S muito semelhante, respectivamente, 14,13% e 13,88%. Os tumores aneuplóides exibem a maior taxa de proliferação celular, 30,1%, seguidos dos tumores diplóides com 19,5% (Figura 10), e usando o teste t verifica-se uma diferença estatisticamente significativa com um $p=0,003$ ($p<0,05$).

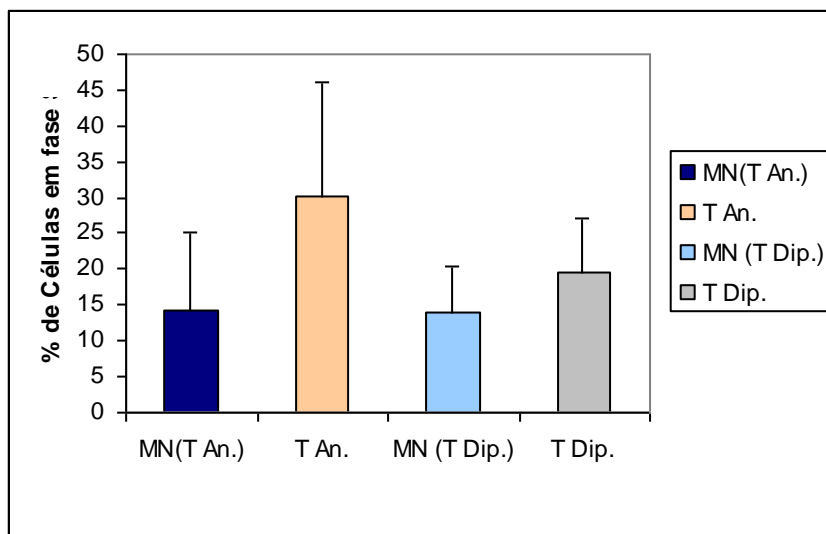


Figura 10 – *Percentagem de células tumorais e da mucosa normal em fase S do ciclo celular.*

Pela observação do gráfico da figura 11 pode-se constatar que os tumores aneuplóides exibem a menor percentagem de células em apoptose (20,15%), por antagonismo, os tumores diplóides são o grupo com maior proporção de células em apoptose, 26,1%. Assim, foi usado o teste t no sentido de avaliar estatisticamente esta diferença, concluindo-se que não era estatisticamente significativa ($p>0,05$). Nas mucosas gástricas normais, verifica-se o mesmo padrão estabelecido para os tumores, assim, nas mucosas provenientes de indivíduos com tumores aneuplóides a percentagem de células em apoptose é de 21,65% enquanto que, nas mucosas de indivíduos com tumores diplóides é de 22,87%.

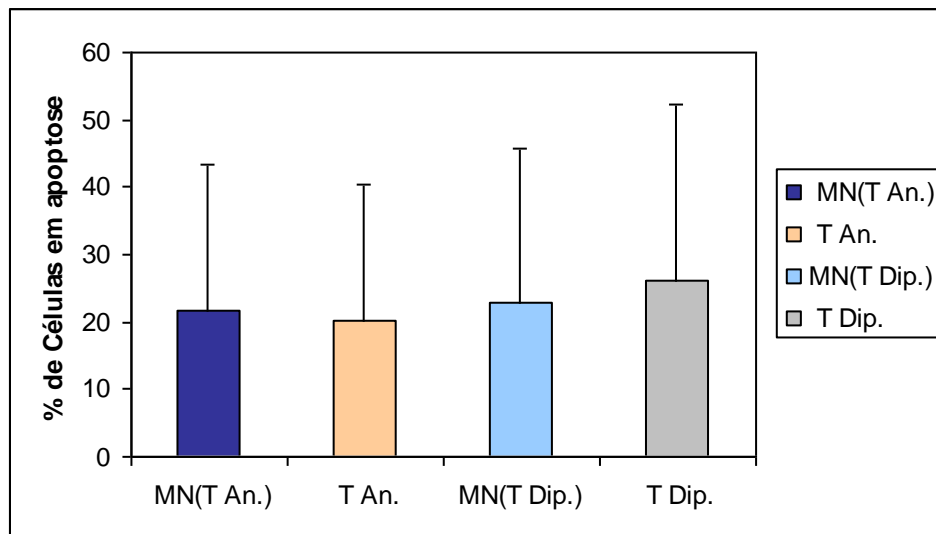


Figura 11– *Percentagem de células tumorais e da mucosa normal em apoptose.*

Os dados contidos na tabela VI permitem-nos concluir que nos CG EBV positivo, 40% são diplóides, 30% são aneuplóides e em 30% não foi possível determinar o conteúdo em DNA. Nos CG EBV negativo, 51,72% são diplóides, 31% são aneuplóides e em 17,24% foi impraticável estabelecer a ploidia do DNA. Constata-se também que em relação à ploidia do DNA, 41,7% dos tumores aneuplóides encontravam-se nos estádios I e II e os restantes 58,3% nos estádios III e IV. No caso dos tumores diplóides, verifica-se uma tendência inversa, uma vez que, 57,9% foram classificados com estágio I e II e 26,3% com estágio III e IV. A avaliação estatística destes dados pelo teste do Qui-quadrado demonstra uma associação significativa com um $p = 0,006$ ($p < 0,05$).

Até a data, foi seguida a evolução clínica dos pacientes e dos 39 indivíduos estudados 6 já faleceram por causas relacionadas com o tumor em questão, e cujo tempo médio de vida após endoscopia digestiva alta ou cirurgia foi de 3,5 meses, variando entre 1 e 6 meses. Usando o teste do Qui-quadrado constata-se uma associação estatisticamente significativa, com um $p = 0,012$ ($p < 0,05$), entre a presença do EBV nas biopsias tumorais e as mortes ocorridas ao longo deste estudo.

Tabela VI– *Correlação do estágio dos tumores com a detecção e quantificação do DNA do EBV e com a ploidia do DNA.*

Paciente Nº	Estádio	Nº de cópias do DNA do EBV	Ploidia
1 [†]		-	
2	IV	-	
3	IA	-	D
4 [†]	IV	-	A
5		13	
6	II	-	A
7	IIIB	-	A
8	II	-	
9	IV	-	A
10	IV	-	
11	II	-	A
12	IA	-	D
13	IB	-	A
14	IB	-	D
15 [†]	IV	64	A
16 [†]		6205	
17	IB	10877	D
18	IB	-	A
19	II	-	D
20	IIIB	-	D
21 [†]	II	18	D
22	IIIA	49	D
23	IB	-	D
24	IV	-	
25 [†]		9	D
26	IA	-	D
27	IA	-	D
28	IIIA	-	D
29		-	D
30	IA	-	D
31	II	18	A
32	IV	7	
33		-	D
34	IIIB	-	A
35	IB	-	D
36	IIIA	20	A
37	IIIA	-	A
38	IIIA	-	D
39	IV	-	D

† - Pacientes falecidos durante o seguimento clínico; A- aneuplóide; D- diplóide.

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos publicados na literatura referem que aproximadamente 10% dos carcinomas gástricos, em todo o mundo, estão associados com o EBV (Rowlands *et al.*, 1993, Nishikawa *et al.*, 1999, zur Hausen *et al.*, 2000, Lo *et al.*, 2001). No entanto, o papel do EBV na patogénese do cancro do estômago ainda não está completamente esclarecido. Apesar, do consenso, de que a via de infecção mais provável do tracto gástrico é pela eliminação periódica do vírus na saliva, muito tem sido especulado sobre a penetração do EBV nas células epiteliais gástricas. Várias investigações efectuadas com linhas celulares provenientes de carcinomas gástricos, negativas para o receptor CD21, comprovaram a infecção dessas células pelo EBV, aflorando assim hipóteses prováveis para a infecção, nomeadamente por intermédio de um receptor celular diferente do CD21 (Yoshiyama *et al.*, 1997) ou por contacto célula a célula (Imai *et al.*, 1998). Maruo e colaboradores, (2001) vieram contribuir para o esclarecimento desta questão, ao demonstrarem que na infecção de células epiteliais, para além da via de infecção dependente da gp350 existe outra via de infecção correlativa à gp25 e independente da gp350. A infecção viral de células epiteliais gástricas origina, na maior parte dos casos, uma infecção de latência. Porém o padrão de expressão dos genes virais é diferente dos três tipos de latência conhecidos, isto porque se verifica a expressão dos EBERs, da EBNA-1, do BARF0, da LMP-2A e ausência da LMP-1 (o maior oncogene do vírus EBV) apesar da expressão da LMP-1 ter sido ocasionalmente referida (Gulley *et al.*, 1996). Nishikawa e colaboradores (1999), demonstraram que estirpes recombinantes do EBV, às quais foram excisados os genes *LMP-1* e *EBNA-2*, eram capazes de infectar e imortalizar células epiteliais e que também possuíam capacidade de converter células cancerígenas em fenótipos mais malignos. À parte da LMP-1, a outro gene viral, o *BARF1*, foi imputado capacidade de transformação e imortalização celular. Com base neste achado, zur Hausen *et al.* (2000), pesquisaram e confirmaram a expressão deste gene em CG positivos para o EBV, sugerindo que o gene *BARF1* funcione como um oncogene viral. Assim, o gene *BARF1* oferece uma via alternativa na mediação viral sobre a oncogénese, para além da LMP-1, acrescentando ainda que este estudo revelou um novo padrão de latência viral nos tumores gástricos associados ao EBV. Outros estudos evidenciaram o potencial da EBNA-1 e dos EBERs na oncogénese e na estimulação do crescimento celular (Young *et al.*, 2003) e também foi demonstrado que a LMP-2A exerce actividade transformante sobre células epiteliais (Scholle *et al.*, 2000).

Embora a base molecular permaneça obscura, estudos publicados indicam que a infecção viral e as proteínas associadas intervenham no desenvolvimento e progressão do carcinoma gástrico, originando mutações nos oncogenes e inactivações nos genes supressores tumorais. Chu e colaboradores (1999), em trabalhos efectuados com diversas neoplasias associadas ao EBV, relataram que, independentemente do tipo de tumor, um terço dos casos comportava mutações no gene *EBNA-4*, mais conhecido por *EBNA-3B*. Uma elevada prevalência de mutações neste gene foi proposta como um mecanismo de escape à resposta imune pelos CTL. Outros estudos vieram acrescentar que essas mutações são importantes no desenvolvimento de tumores associados ao EBV (de Campos-Lima *et al.*, 1993). Ishii *et al.* (2001), referenciaram que o EBV pode levar a que as células do hospedeiro inibam a expressão da p53 e induzam a expressão do *c-myc* na fase inicial do desenvolvimento do carcinoma gástrico. Mas, em estágios mais avançados, a influência na expressão do *c-myc* torna-se negativa, causando uma diminuição da regressão tumoral por mecanismos de apoptose, o que possivelmente explica a resistência ao tratamento por tumores em fase mais avançada.

Em Portugal, apesar da diminuição da incidência, o cancro do estômago continua a ser uma das principais causas de morte por tumores malignos. Nas últimas décadas, tem-se verificado uma mudança no estilo de vida, hábitos alimentares, métodos de preservação e armazenamento de alimentos, que parecem estar associados ao declínio deste carcinoma, especialmente o carcinoma gástrico do tipo intestinal. Segundo a classificação de Lauren, os carcinomas gástricos podem ser classificados em dois tipos: o intestinal, que é o carcinoma gástrico tipo epidémico, expansivo, retém a estrutura glandular, com uma margem bem definida e associado com a gastrite crónica atrófica. O tipo difuso que é um carcinoma infiltrativo, endémico, caracterizado por aglomerados de células isoladas, pouco diferenciado e com margem de difícil individualização. Normalmente invade grandes áreas do estômago, é mais agressivo e ocorre com maior frequência em indivíduos mais jovens. Está mais associado a factores genéticos, reconhecendo-se pouco a influência do ambiente e da dieta alimentar.

Neste estudo, verifica-se que 54% dos tumores gástricos pertencem ao tipo intestinal e somente 33% ao tipo difuso. Talvez este facto possa contribuir para explicar a elevada incidência desta neoplasia no nosso país, uma vez que o tipo histológico que tem

contribuído para a diminuição deste tumor ao longo do tempo, pelo nosso estudo, parece ser o predominante. A alteração da incidência parece estar relacionada com alterações do tipo de carcinomas – diminuição do número de carcinomas do tipo intestinal e manutenção do número de carcinomas do tipo difuso. É importante realçar que os nossos dados são corroborados por um estudo recente realizado em Portugal (Carvalho *et al.*, 2003) e por trabalhos efectuados num país reconhecidamente afectado por esta patologia, o Japão (Kattoor *et al.*, 2002 e Koriyama *et al.*, 2002).

Em termos de localização constatamos que o antro é o sítio com maior percentagem de CG, 35,9% o que vai ao encontro a alguns estudos já publicados, como o de Kattoor *et al.* (2002) e Koriyama *et al.*, (2001). Porém, para países ocidentais, outros trabalhos apontam para uma supremacia da localização do CG a nível do cárdia, entre 40 a 50% dos casos (Powell e McConkey, 1990, Blot *et al.*, 1991), isto porque a dieta alimentar praticada nesses países diminui o risco de cancro a nível do antro. Os resultados deste trabalho, sugerem uma distribuição relativamente homogénea dos CG EBV positivo e, apoiando-nos nos conhecimentos actuais, ainda não foi encontrado nenhum consenso sobre a localização mais frequente dos CG EBV positivo (Chang *et al.*, 2000).

Neste estudo, o genoma do EBV foi detectado em 25,6% dos CG o que, se compararmos com investigações semelhantes realizadas noutros países, é umas das taxas mais elevadas. Foi relatado uma incidência de 7% no Japão, 16% nos EUA, 8,7% na Rússia e 18% na Alemanha (Koriyama *et al.*, 2001). Outros estudos, como o de Chang *et al.* (2001), realizado na Coreia, reportaram uma percentagem de 5,6%; Herrera-Goepfert *et al.* (1999), no México, referem uma percentagem de 8,2%; Hoshikawa *et al.* num estudo publicado em 2002, no Japão, citaram uma percentagem de 14%; Koriyama *et al.* (2001) encontraram diferentes percentagens de CG EBV positivos, 4,7% para brasileiros oriundos do Japão e 11,2% para naturais do Brasil e Carrascal *et al.* (2003), na Colômbia, reportaram 13% de CG EBV positivos.

Um parâmetro que é referido em vários trabalhos é uma maior incidência de CG EBV positivos em homens com taxas (homens vs mulheres) que podem variar desde 7,0 até 1,1 (Herrera-Goepfert *et al.*, 1999, Chang *et al.*, 2001, Kattoor *et al.*, 2002, Moritani *et al.*, 2002, Carrascal *et al.*, 2003). Contudo, tal não foi aqui verificado, encontrou-se sim uma percentagem igual em ambos os sexos. Este achado poderá ser explicado por uma

incidência de CG, em Portugal, semelhante entre homens e mulheres (INE, 2003), como testemunhado pela nossa amostragem e por Carvalho *et al.* (2003) e também pela ausência de factores ambientais aos quais os homens pudessem estar mais expostos e que são apontados por muitos investigadores como causa para a predominância masculina (Koriyama *et al.*, 2001). Todavia, parece não existir acordo sobre este assunto tendo já sido publicado um estudo onde foi verificado um número mais elevado de CG EBV positivo em mulheres (Koriyama *et al.* 2001).

Neste trabalho, comprova-se que os CG EBV positivos e classificáveis pela nomenclatura TNM exibem, na generalidade, piores factores de prognóstico do que os CG EBV negativos. Designadamente, 100% dos casos positivos para o EBV apresentam uma invasão da parede gástrica superior ao tipo T1 (invasão da mucosa ou da submucosa), enquanto que nos CG EBV negativos se verifica uma percentagem inferior (80%). Neste sentido, existem estudos que apontam para que carcinomas positivos para o EBV sejam mais agressivos porque apresentam maior invasividade (Teramoto *et al.*, 2000) e, mais recentemente, este achado foi validado por Kassis e colaboradores (2002) em relação aos carcinomas gástricos. Quanto à invasão tumoral dos gânglios linfáticos regionais, a tendência supramencionada é também confirmada, já que as metástases ganglionares foram detectadas em 83% dos tumores gástricos associados ao EBV e em 60% dos CG EBV negativos. Nas metástases distantes do tumor primário, apesar do pior cenário ser observado nos CG EBV negativo (75% vs 33% de casos com metástases distantes), tal não parece ser suficiente para influenciar um agravamento do estágio, uma vez que 86% dos tumores associados ao EBV apresentam um estágio superior a I, em contraste com uma percentagem de 62% para os CG EBV negativos.

A infecção primária pelo EBV é sugerida pela presença de anticorpos IgM para os antígenos VCA e EBNA; porém 80% dos doentes com infecção activa também produzem anticorpos para o EA. Um aumento das IgG para o VCA, sem contudo existir produção de IgG para o EBNA, até ao fim de 4 semanas de doença, também indica uma infecção recente. Uma infecção passada é caracterizada pela detecção de IgG para os antígenos VCA e EBNA e, numa reactivação, encontra-se IgG para o EBNA e um aumento de IgG para o EA. A primeira constatação a salientar sobre os resultados obtidos no conjunto da população com tumor gástrico e da população controlo é que se verifica uma

seropositividade para o EBV na ordem de 95%, o que vai de encontro ao publicado na literatura, já que é afirmado que, pela terceira década de vida, 80-100% dos indivíduos tornam-se seropositivos para o EBV (IARC, 1997, Chu *et al.*, 1999, Enbom *et al.*, 2001, Feng *et al.*, 2002, Carrascal *et al.* 2003). Globalmente, os indivíduos estudados manifestam infecção passada, com excepção de um paciente da população de CG EBV positivo, que exhibe uma reactivação da infecção, e de dois doentes do grupo dos CG EBV negativo, que são seronegativos. É importante aqui evidenciar o perfil serológico que foi tido em conta para infecções antigas. Assim, foi considerado o padrão típico, que corresponde à detecção de IgG para os antígenos VCA e EBNA, a detecção só de anticorpos VCA-IgG, já que em alguns indivíduos pode ocorrer um desaparecimento das EBNA-IgG, e ainda a presença exclusiva das EBNA-IgG, perfil típico de uma infecção latente. Shinkura e colaboradores (2000) referenciaram que doentes com tumores gástricos associados ao EBV, apresentam níveis mais elevados de anticorpos séricos específicos para o EBV, nomeadamente os anticorpos IgG anti-VCA e EA, do que indivíduos com CG EBV negativo. Este achado foi verificado neste trabalho, além de que esta asseveração também foi corroborada para os anticorpos EBNA-IgG (figura 8). Apesar de constituir um único caso, mas com o apoio dado pelos resultados do estudo supramencionado, arriscamos afirmar que a reactivação do EBV ocorre *in vivo* e tal poderá resultar de uma resposta imune celular deficiente. Como anteriormente referido, e com base nos dados obtidos na análise serológica, em que se verifica que o *kit* VCA (p18) IgG era mais sensível do que o homólogo, que usa como antígeno a gp125, foi assumido que amostras positivas no VCA (p18) IgG e negativas no VCA (gp125) IgG seriam consideradas positivas. Esta ilação é fundamentada pelo trabalho efectuado por Hinderer *et al.* (1999), em que os autores verificaram que a p18 era claramente o melhor antígeno quando comparada com a gp125, quer para a pesquisa de IgM, quer para a pesquisa de IgG.

A PCR em tempo real é uma nova técnica que permite quantificar de uma forma rápida e exacta uma grande quantidade de produtos amplificados (Kimura *et al.*, 1999). É um método mais célere que a PCR tradicional uma vez que não requer manipulação pós-amplificação. Para além disso, esta técnica elimina as precauções a tomar com os produtos amplificados de forma a evitar possíveis contaminações, uma vez que a reacção se processa em poços completamente selados, o que constitui um grande progresso sobre a

PCR convencional que possui um risco considerável de contaminação. Com a sua rapidez, exactidão, possibilidade de manusear muitas amostras e capacidade de quantificar de uma forma precisa o DNA pretendido, a PCR em tempo real poderá ser de grande importância se tivermos em conta o uso desta técnica em rotinas de diagnóstico (Leung *et al.*, 2002).

Embora os tumores associados ao EBV sejam frequentemente caracterizados por títulos anormalmente elevados contra os anticorpos EA IgG e VCA IgG, este padrão não é específico da oncogénese e pode também ser presenciado em pacientes com doenças auto-imunes ou outras disfunções imunitárias. Por outro lado, doentes imunocomprometidos têm respostas humorais inconsistentes contra o EBV e, por isso, a serologia não é um marcador fiável do estado clínico. Nesses pacientes, a amplificação do DNA viral é mais fidedigna para a identificação de doenças relacionadas com o EBV (Leung *et al.*, 2002). Esta explicação poderá servir-nos de suporte na compreensão do caso em que a PCR da saliva e da mucosa gástrica normal foi positiva, mas a pesquisa serológica foi negativa. À parte esta excepção, confirmou-se uma reciprocidade nos resultados obtidos na serologia com os auferidos na PCR.

Brengel-Pesce *et al* (2002) publicaram um estudo em que utilizaram a PCR em tempo real para quantificar o DNA do EBV em diferentes populações e em diversas amostras. Assim, em indivíduos saudáveis, detectaram, em amostras de saliva, entre 2 a 6543 cópias/ μ g DNA. Em indivíduos imunodeprimidos, no mesmo tipo de amostra, encontraram entre 39400 a 331130 cópias/ μ g DNA. Analisaram também soros sanguíneos e, nos indivíduos saudáveis, a PCR revelou-se negativa e, na população dos imunodeprimidos, só um soro foi positivo com uma quantidade de 172 cópias/ μ g DNA. Embora as populações de estudo não sejam totalmente coincidentes, os dados desta investigação permitem-nos retirar algumas ilações e daí parecem emergir algumas semelhanças entre resultados. Assim, como referido anteriormente (tabela VI), para a população controlo não detectamos DNA viral no soro sanguíneo. Na saliva, a quantidade média de DNA viral por nós encontrada foi de 1527 cópias/ μ g DNA, valor que se encontra dentro do limite estabelecido por Brengel-Pesce *et al.*. Contudo, a nossa percentagem de salivas positivas (25%) é diferente da do estudo em questão (66,7%), talvez pelo número reduzido de indivíduos que fazem parte da nossa população controlo. Quanto à população de indivíduos com tumores gástricos, parece-nos existir um padrão intermédio entre os

resultados reportados por Brengel-Pesce *et al.* para indivíduos saudáveis e para indivíduos imunodeprimidos.

Na medição do conteúdo de DNA cromossômico (figura 9), verificamos que 61,3% dos tumores são diplóides enquanto que 38,7% possuem um perfil aneuplóide e, destes, 16,7% são tetraplóides. Na literatura constatamos que os nossos valores de aneuploidia se encontram dentro da gama mais frequentemente referida para carcinomas gástricos, uma percentagem que ronda os 40% (Danesi *et al.*, 2000). Todavia, foi citado que a proporção de tumores gástricos aneuplóides pode variar entre 36 a 89% (Russo *et al.*, 2001). Como por muitas vezes referenciado na bibliografia, foi também reconhecido que o estado de aneuploidia se associa a um pior prognóstico neste tipo de tumores (Sugai *et al.*, 1999, Danesi *et al.*, 2000, Russo *et al.*, 2001). Assim, verificou-se que a percentagem de metástases nos gânglios linfáticos regionais é maior nos tumores aneuplóides (82%) do que nos carcinomas diplóides (44%) (Maehara *et al.*, 1995, Kim e Cho, 2000, Russo *et al.*, 2001) e também, em relação à invasão da parede gástrica, se observa que os tumores aneuplóides apresentam uma taxa de invasão superior ao tipo T1, maior (100%) do que os tumores diplóides (69%) (Sugai *et al.*, 1999, Russo *et al.*, 2001). Estas associações foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado, comprovando-se serem estatisticamente significativas com p de 0,048 e 0,04, respectivamente. A presença de metástases distantes do tumor primário acentua esta orientação, uma vez que, 75% dos tumores aneuplóides apresentam metástases distantes, em contraste com uma percentagem de 33% para os carcinomas diplóides. Resumindo, a aneuploidia está associada a estádios (classificação TNM) mais avançados (Russo *et al.*, 2001). Quanto ao tipo histológico, conferiu-se que os tumores intestinais revelam uma percentagem de aneuploidia (53%) maior que os carcinomas difusos (20%) (Kim e Cho, 2000).

Na determinação da percentagem de células tumorais em fase S, constataram-se valores um pouco mais elevados do que os valores referidos noutros estudos (Inada *et al.*, 1997, Kim e Cho, 2000, Danesi *et al.*, 2000, Russo *et al.*, 2001, Slender *et al.*, 2001). Assim, obteve-se uma percentagem de células em fase S de $24 \pm 13\%$ para a globalidade dos tumores gástricos, de $30 \pm 16\%$ para os tumores aneuplóides e de $19,5 \pm 7,6\%$ para os tumores diplóides. Na literatura, estão descritas percentagens que variam entre 12,17 a 15,7% para carcinomas gástricos, entre 20 a 22,7% para carcinomas gástricos aneuplóides e entre 6,88 a 14,3% para carcinomas gástricos diplóides. Todavia, este trabalho está de

acordo com os resultados descritos em que os valores mais elevados de fase S são verificados nos tumores aneuplóides. Foi igualmente citado que, para tumores muito proliferativos, a taxa de apoptose é superior à dos tumores pouco proliferativos (Slender *et al.*, 2001), o que nos parece ser este caso, já que a percentagem de apoptose obtida foi de $23,5 \pm 20,9\%$, uma das mais elevadas quando comparada com as de outros trabalhos.

Apesar da curta duração do seguimento clínico, a sobrevivência foi significativamente diferente nos tumores associados ao EBV e nos carcinomas EBV negativos, assim nos CG EBV positivos verifica-se uma taxa de mortalidade na ordem dos 40% em contraste, com uma taxa de 18,2% para os CG EBV negativos.

Em suma, este estudo evidencia uma associação dos tumores gástricos com o EBV e, como já referido, esta variável emerge como um factor de pior prognóstico. A aneuploidia está correlacionada com uma elevada actividade proliferativa e a sua incidência é maior em tumores com estádios mais avançados e em carcinomas com histologia do tipo intestinal. Estas variáveis biológicas, em conjunto com marcadores clinicopatológicos, podem identificar pacientes com maior risco de recidivar e que são susceptíveis de beneficiar de terapêuticas mais específicas, como cirurgias mais agressivas, inclusão de medicação adjuvante e planos de seguimento mais eficientes. Parece, contudo, serem necessários mais estudos epidemiológicos, histológicos e moleculares para confirmar estas observações e avaliar a frequência da infecção pelo EBV e a associação dos carcinomas gástricos ao EBV na população portuguesa em geral.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Diferenciação da estirpe de EBV (EBV1 ou EBV2) presente nos tumores gástricos em que o vírus foi detectado.
- Caracterização do padrão de expressão dos genes virais em carcinomas gástricos positivos para o EBV.
- Determinação da correlação entre a infecção viral e mutações ou alterações na expressão de oncogenes e de genes supressores tumorais.
- Avaliação da imunidade celular, o que poderá contribuir para melhorar as terapêuticas imunológicas e definir novos marcadores prognósticos de evolução tumoral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot, S. D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., Rickinson, A. B.** (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of virus encoded latent membrane protein. *J Virol.* **64**: 2126-2134.
- Allday, M. J., Crawford, D. H., Thomas, J. A.** (1993). Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. *J Gen Virol.* **74**: 361-369.
- American Joint Committee on Cancer.** (2002). Cancer staging handbook. 6th edição: 111-118.
- Applied Biosystems.** (2001). Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents- Gene Expression Quantification-Protocol: 5.
- Armstrong, A. A., Alexander, F. E., Cartwright, R., Angus, B., Krajewski, A. S., et al.** (1998). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia.* **12**: 1272-1276.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., et al.** (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr genome. *Nature.* **310**: 207-211.
- Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F., Kieff, E.** (1985). Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J Virol.* **54**: 665-674.
- Biggin, M., Bodescot, M., Perricaudet, M., Farrell, P.** (1987). Epstein-Barr virus gene expression in P3HR1- superinfected Raji cells. *J Virol.* **61**: 3120-3132.
- Blot, W. J., Devesa, S. S., Kneller, R. W., Fraumeni, J. F.** (1991). Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA.* **265**: 1287-1289.
- Bornkamm, G., Delius, H., Zimmer, U., Hudewentz, J., Epstein, M. A.** (1980). Comparison of Epstein-Barr virus strains of different origin by analysis of the viral DNAs. *J Virol.* **35**: 603-618.
- Bornkamm, G. W., Hudewentz, J., Freese, U. K., Zimmer, U.** (1982). Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region. *J Virol.* **43**: 952-968.
- Brengel-Pesce, K., Morand, P., Schmuck, A., Bourgeat, M. J., Buisson, M., Barguès, G., Bouzid, M., Seigneurin, J. M.** (2002). Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-B arr virus infections. *J Med Virol.* **66**: 360-369.
- Brink, A. A., ten Berge, R. L., van den Brule, A. J., Willemze, R., Chott, A., Meijer, C. J.** (2000). Epstein-Barr virus is present in neoplastic cytotoxic T cells in extranodal, and predominantly in B cells in nodal T non-Hodgkin lymphomas. *J Pathol.* **191**: 400-406.

- Brooks, L. A., Lear, A. L., Young, L.S., Rickinson, A. B.** (1993). Transcripts from the Epstein-Barr virus BamHI A fragment are detectable in all three forms of virus latency. *J Virol.* **67**: 3182-3190.
- Brousset, P., Knecht, H., Rubin, B., Drouet, E., Chittal, S., Meggetto, F., Saati, T. A., Bachmann, E., Denoyel, G., Sergeant, A., et al.** (1993). Demonstration of Epstein-Barr virus replication in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood.* **82**: 872-876.
- Burke, A. P., Yen, T. S. B., Shekita, K. M., Sobin, L. H.** (1990). Lymphoepithelial carcinoma of stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol.* **3**: 377-380.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., Longnecker, R.** (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity.* **9**: 405-411.
- Callan, M. F. C., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J. D. K., Moss, P. A. H., Gillespie, G. M., Bell, J. I., Rickinson, A. B., McMichael, A. J.** (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nature Med.* **2**: 906-911.
- Carrascal, E., Koriyama, C., Akiba, S., Tamayo, O. et al.** (2003). Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Cali, Colombia. *Onc Rep.* **10**: 1059-1062.
- Carvalho, B., Pinto, M., Cirnes, L., Oliveira, C., Machado J. C., Suriano, G., Hamelin, R., Carneiro, F., Seruca, R.** (2003). Concurrent hypermethylation of gene promoters is associated with a MSI-H phenotype and diploidy in gastric carcinomas. *Eur J Can.* **39**: 1222-1227.
- Chang, M. S., Kim, W. H., Kim, C. W., Kim, Y. I.** (2000). Epstein-Barr virus in gastric carcinomas with lymphoid stroma. *Histopt.* **37**: 309-315.
- Chang, M. S., Lee, H. S., Kim, C. W., Kim, Y. I., Kim, W. H.** (2001). Clinicopathologic characteristics of Epstein-Barr virus-incorporated gastric cancer in Korea. *Path. Res. Pract.* **197**: 395-400.
- Chang, R. S., Lewis, J. P., Abildgaard, C. F.** (1973). Prevalence of oropharyngeal excretors of leukocyte-transforming agents among human population. *N Engl J Med.* **289**: 1325-1329.
- Chen, F., Zou, J-Z., di Renzo, L., Winberg, G., Hu, L-F., Klein, E., Klein, G., Ernberg, I.** (1995). A subpopulation of normal B cells latency infected with Epstein-Barr virus resembles Burkitt lymphoma cells in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP1. *J Virol.* **69**: 3752-3758.
- Chu, P. G., Chang, K. L., Chen, W-G., Chen, Y-Y., Shibata, D., Hayashi, K., Bacchi, C., Bacchi, M., Weiss, L. M.** (1999). Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen

- (EBNA)-4 mutation in EBV-associated malignancies in three different populations. *Am J Pathol.* **155**: 941-947.
- Correa, P.** (1988). A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Research.* **48**: 3554-3560.
- Crawford, D. H., Swerdlow, A. J., Higgins, C., McAulay, K., Harrison, N., Williams, H., Britton, K., Macsween, K. F.** (2002). Sexual history and Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis.* **186**: 731-736
- Dambaugh, T., Beisel, C., Hummel, M., et al.** (1980). EBV DNA VII: molecular cloning and detailed mapping of EBV (B95-8) DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **77**: 2999-3003.
- Danesi, D. T., Spanò, M., Fabiano, A., Altavista, P., Pasqualetti, P. et al.** (2000). Flow cytometry DNA ploidy, p53, PCNA, and c-erbB-2 protein expression as predictors of survival in surgically resected gastric cancer patients. *Cytom.* **42**: 27-34.
- Dawson, C. W., Traumoontanis, G., Eliopoulos, A. G., Young, L. S.** (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem.* **278**: 3694-3704.
- de Campos-Lima, P. O., Gavioli, R., Zhang, Q-J., Wallace, L. E., Dolcetti, R., Rowe, M., Rickinson, A. B., Masucci, M. G.** (1993). HLA-A11 epitope loss isolates of Epstein-Barr virus from a highly A11+ population. *Science.* **260**: 98-100.
- Delius, H. e Bornkamm, G. W.** (1978). Heterogeneity of Epstein-Barr virus. III. Comparison of a transforming and a nontransforming virus by partial denaturation mapping of their DNAs. *J Virol.* **27**: 81-89.
- Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W., Young, L. S.** (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem.* **274**: 16085-16096.
- Eliopoulos, A. G. e Young, L. S.** (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein- Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene.* **16**: 1731-1742.
- Enbom, M., Strand, A., Falk, K. I., Linde, A.** (2001). Detection of Epstein-Barr Virus, but not Human Herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. *Sex Trans Dis.* **28**: 300-306.
- Epstein, M. A. e Barr, Y. M.** (1964). Cultivation *in vitro* of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet.* **1**: 252-253.

- Farina, A., Santarelli, R., Gonnella, R., Bei, R., Muraro, R., et al.** (2000). The *BFRF1* gene of Epstein-Barr virus encodes a novel protein. *J Virol.* **74**: 3235-3244.
- Feng, W-h., Westphal, E., Mauser, A., Raab-Traub, N., Gulley, M. L., Busson, P., Kenney, S. C.** (2002). Use of adenovirus vectors expressing Epstein-Barr virus (EBV) immediate-early protein BZLF1 or BRFL1 to treat EBV-positive tumors. *J Virol.* **76**: 10951-10959.
- Fennewald, S., van Santen, V., Kieff, E.** (1984). The nucleotide sequence of messenger RNA transcribed in latent growth transforming virus infection indicates that it may encode a membranar protein. *J Virol.* **51**: 411-419.
- Fiedls, B. e Knipe, D.** (1996). *Fields Virology*- Third Edition. Lippincott-raven Press.
- Gerber, P., Walsh J. N., Rosenblum, E. N., Purcell, R. H.** (1969). Association of EB-virus infection with the post-perfusion syndrome. *Lancet.* **1**: 593-596.
- Gibson, T. J., Barrell, B. G., Farrell, P. J.** (1986). Coding content and expression of the EBV B95-8 genome in the region from base 62,248 to base 82,920. *Virology.* **152**: 146-148.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., Hammerschmidt, W.** (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J.* **18**: 3064-3073.
- Gratama, J. W., Lennette, E. T., Lönnqvist, B., Oosterveer, M. A. P., Klein, G., Ringdén, O., Ernberg, I.** (1992). Detection of multiple Epstein-Barr viral strains in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Med Virol.* **37**: 39-47.
- Gulley, M. L., Pulitzer, D. R., Eagan, P. A., Schneider, B. G.** (1996). Epstein-Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. *Hum Pathol.* **27**: 20-27.
- Hayward, S. D., Lazarowitz, S., Hayward, G. S.** (1982). Organization of the Epstein-Barr virus DNA molecule. II. Fine mapping of the boundaries of the internal repeat cluster of B95-8 and identification of additional small tandem repeats adjacent to the HR-1 deletion. *J Virol.* **43**: 201-212.
- Hedley, D. W., Friedlander, M. L., Taylor, I. W., Rugg, C. A., Musgrove, E. A.** (1983). Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem.* **31**: 1333-1335.
- Heller, M., Dambaugh, T., Kieff, E.** (1981). Epstein-Barr virus DNA. IX. Variation among viral DNAs from producer and nonproducer infected cells. *J Virol.* **38**: 632-648.

- Hennesy, K. e Kieff, E.** (1985). A second nuclear protein is encoded by EBV in latent infection. *Science*. **227**: 1238-1240.
- Herrera-Goepfert, R., Reyes, E., Hernández-Avila, M., Mohar, A., Shinkura, R., Fujiyama, C., et al.** (1999). Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Mexico: analysis of 135 consecutive gastrectomies in two hospitals. *Mod Pathol*. **12**: 873-878.
- Herrmann, K. e Niedobitek, G.** (2003). Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. *J Pathol*. **199**: 140-145.
- Hinderer, W., Lang, D., Rothe, M., Vornhagen, R., Sonneborn, H. H., Wolf, H.** (1999). Serodiagnosis of Epstein-Barr virus infection by using recombinant viral capsid antigen fragments and autologous gene fusion. *J Clin Microb*. **37**: 3239-3244.
- Ho, M., Miller, G., Atchison, R. W. et al.** (1985). Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J Infect Dis*. **152**: 876-886.
- Hoshikawa, Y., Satoh, Y., Murakami, M., Maeta, M., Kaibara, N., Ito, H., Kurata, T., Sairenji, T.** (2002). Evidence of lytic infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-positive gastric carcinoma. *J Med Virol*. **66**: 351-359.
- Hudson, G. S., Farrell, P. J., Barrel, B. G.** (1985). Two related but differentially expressed potential membrane proteins encoded by the EcoRI Dhet region of Epstein-Barr virus B95-8. *J Virol*. **53**: 528-535.
- Hudson, G. S., Gibson, T. J., Barrel, B. G.** (1985a). The BamHI F region of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Virology*. **147**: 99-109.
- Imai, S., Nishikawa, J., Takada, K.** (1998). Cell-to-cell as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol*. **72**: 4371-4378.
- Inada, T., Ichikawa, A., Igarashi, S., Kubota, T., Ogata, Y.** (1997). Effect of preoperative 5-fluorouracil on apoptosis of advanced gastric carcinoma. *J Sur Onc*. **65**: 106-110.
- Instituto Nacional de Estatística.** (2003). Estatísticas da Saúde 2001: 164-165.
- International Agency for Research on Cancer (IARC).** (1997). Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma- herpesvirus/ human herpesvirus 8. **70**. WHO: Lyon.
- Ishii, H., Gobé, G., Kawakubo, Y., Sato, Y., Ebihara, Y.** (2001). Interrelationship between Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis- associated proteins. *Histopathology*. **38**: 111-119.

- Iwasaki, Y., Chong, J.-M., Hayashi, Y., Ikeno, R., Arai, K., Kitamura, M., Koike, M., Hirai, K., Fukayama, M.** (1998). Establishment and characterization of a human Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in SCID mice. *J Virol.* **72**: 8321-8326.
- Jones, M., Foster, L., Sheedy, T., Griffin, B. E.** (1984). The EB virus genome in Daudi Burkitt's lymphoma cells has a deletion similar to that observed in a non-transforming strain (P3HR-1) of the virus. *EMBO J.* **3**: 813-821.
- Kassis, J., Maeda, A., Teramoto, N., Takada, K., Wu, C., Klein, G., Wells, A.** (2002). EBV-expressing ags gastric carcinoma cell sublines present increased motility and invasiveness. *Int J Cancer.* **99**: 644-651.
- Kattoor, J., Koriyama, C., Akiba, S., Itoh, T., Ding, S., Eizuru, Y., Abraham, E., Chandralekha, B., Amma, N. S., Nair, M. K.** (2002). Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in southern India: a comparison with a large -scale Japanese series. *J Med Virol.* **68**: 384-389.
- Kim, J. Y. e Cho, H. J.** (2000). DNA ploidy patterns in gastric adenocarcinoma. *J Korean Med Sci.* **15**: 159-166.
- Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Takaharu, M., Morishima, T.** (1999). Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* **37**: 132-136.
- Knipe, D. M. e Howley, P. M.** (2001). Fields Virology. 4th edição. Lippincott Williams & Wilkins.
- Knutson, J. C.** (1990). The level of *c-fgr* RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol.* **64**: 2530-2536.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., Takada, K.** (1999). Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol.* **73**: 9827-9831.
- Koriyama, C., Akiba, S., Iriya, K., Yamaguti, T., Hamada, G. S., Itoh, T., et al.** (2001). Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians in São Paulo. *Jpn J Cancer Res.* **92**: 911-917.
- Koriyama, C., Akiba, S., Itoh, T., Kijima, Y., Sueyoshi, K. et al.** (2002). Prognostic significance of Epstein-Barr virus involvement in gastric carcinoma in Japan. *Int J Mol Med.* **10**: 635-639.
- Lawrence, J. B., Singer, R. H., Marselle, L. M.** (1989). Highly localized tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualized by *in situ* hybridization. *Cell.* **57**: 493-502.

- Lee, E. S., Locker, J., Nalesnik, M., Reyes, J., Jaffe, R., Alashari, M., Nour, B., Tzakis, A., Dickman, P. S.** (1995). The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. *New Engl J Med.* **332**: 19-25.
- Lee, M-A. e Yates, J. L.** (1992). BHRF1 of Epstein-Barr virus, which is homologues to human proto-oncogene bcl-2, is not essential for transformation of B cells or for virus replication in vitro. *J Virol.* **66**: 1899-1906.
- Leung, E., Shenton, B. K., Jackson, G., Gould, F. K., Yap, C., Talbot, D.** (2002). Use of real-time PCR to measure Epstein-Barr virus genomes in whole blood. *J Immunol Meth.* **270**: 259-267.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G., Masucci, M. G.** (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature.* **375**: 685-688.
- Li, Q-X., Spriggs, M. K., Kovats, S., Turk, S. M., Comeau, M. R., Nepom, B., Hutt-Fletcher, L. M.** (1997). Epstein-Barr virus use HLA classII as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol.* **71**: 4657-4662.
- Liebowitz, D., Kopan, R., Fuchs, E., Sample, J., Kieff, E.** (1987). An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Mol Cell Biol.* **7**: 2299-2308.
- Lo, Y. M. D., Chan, W. Y., Enders, K. W. N., Chan, L. Y. S., Lai, P. B. S., Tam, J. S., Chung, S. C. S.** (2001). Circulating Epstein-Barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Can Res.* **7**: 1856-1859.
- Longnecker, R.** (2000). Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res.* **79**: 175-200.
- Longnecker, R. e Kieff, E.** (1990). A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J Virol.* **64**: 2319-2326.
- Luqmani, Y. A., Linjawi, S. O., Shousha, S.** (2001). Detection of Epstein-Barr virus in gastrectomy specimens. *Oncol Rep.* **8**: 995-999.
- Maehara, Y., Oshiro, T., Baba, H., Ohno, S., Kohnoe, S., Sugimachi, K.** (1995). Lymphatic invasion and potential for tumor growth and metastasis in patients with gastric cancer. *Sur.* **117**: 380-385.
- Marchini, A., Tomkinson, B., Cohen, J. I., Kieff, E.** (1991). BHRF1, the Epstein-Barr virus gene with homology to *bcl2*, is dispensable for B -lymphocyte transformation and virus replication. *J Virol.* **65**: 5991-6000.

- Marschall, M., Schwarzmann, F., Leser, U., Oker, B., Alliger, P., Mairhofer, H., Wolf, H.** (1991). The B1 LF4 *trans*-activator of Epstein-Barr virus is modulated by type and differentiation of the host cell. *Virology*. **181**: 172-179.
- Maruo, S., Yang, L., Takada, K.** (2001). Roles of Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells. *J Gen Virol*. **82**: 2373-2383.
- Mauser, A., Holley-Guthrie, E., Zanation, A., Yarborough, W., Kaufmann, W., Klingelhutz, A., Seaman, W. T., Kenney, S.** (2002). The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 induces expression of E2F-1 and other proteins involved in cell cycle progression in primary keratinocytes and gastric carcinoma cells. *J Virol*. **76**: 12543-12552.
- Miller, G., Niederman, J. C., Andrews, L-L.** (1973). Prolonged oropharyngeal excretion of EB virus following infectious mononucleosis. *N Engl J Med*. **288**: 229-232.
- Miller, N. e Hutt-Fletcher, L.** (1988). A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus. *J Virol*. **62**: 2366-2372.
- Moritani, S., Sugihara, H., Kushima, R., Hattori, T.** (2002). Different roles of p53 between Epstein-Barr virus-positive and-negative gastric carcinomas of matched histology. *Vir Arch*. **440**: 367-375.
- Niederman, J.C., Miller, G., Pearson, H., Pagano, J.** (1976). Patterns of excretion of Epstein-Barr virus in saliva and other oropharyngeal sites during infectious mononucleosis. *N Engl J Med*. **294**: 1355-1359.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D. H., Young, L. S.** (1997). Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol*. **182**: 151-159.
- Neidobitek, G., Herbst, H., Young, L. S., Rowe, M., Dienemann, D., Germer, C., Stein, H.** (1992). Epstein-Barr virus and carcinomas: Expression of the viral genome in an undifferentiated gastric carcinoma. *Diagn Mol Pathol*. **1**:103-108.
- Niedobitek, G., Young, L. S., Sam, C. K., Brooks, L., Prasad, U., Rickinson, A. B.** (1992). Expression of Epstein-Barr virus genes and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas. *Am J Pathol*. **140**: 879-887.
- Nishikawa, J., Imai, S., Oda, T., Kojima, T., Okita, K., Takada, K.** (1999). Epstein-Barr virus promotes epithelial cell growth in the absence of EBNA2 and LMP1 expression. *J Virol*. **73**: 1286-1292.
- Nitsche, F., Bell, A., Rickinson, A. B.** (1997). Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J Virol*. **71**: 6619-6628.

- Ohfuji, S., Osaki, M., Tsujitani, S. et al.** (1996). Low frequency of apoptosis in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas with lymphoid stroma. *Int J Cancer*. **68**: 710-715.
- Organização mundial de Saúde.** (2002). The World Health Report 2002: 188-191.
- Pallesen, G., Sandvej, K., Hamilton-Dutoit, S. J., Rowe, M., Young, L. S.** (1991). Activation of Epstein-Barr virus replication in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*. **78**: 1162-1165.
- Parker, G. A., Crook, T., Bain, M., Sara, E. A., Farrell, P. J., Allday, M. J.** (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene*. **13**: 2541-2549.
- Petti, L. e Kieff, E.** (1988). A sixth Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA3B) is expressed in latently infected growth transformed lymphocytes. *J Virol*. **62**: 2173-2178.
- Powell, J. e McConkey, C. C.** (1990). Increasing incidence of adenocarcinoma of gastric cardia and adjacent sites. *Br J Cancer*. **62**: 440-443.
- Pulvertaft, R. J. V.** (1964). Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma). *Lancet*. **1**: 238-240.
- Raab-Traub, N.** (2002). Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Cancer Biol*. **12**: 431-441.
- Rabson, M., Gradoville, L., Heston, L., Miller, G.** (1982). Nonimmortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J Virol*. **44**: 834-844.
- Radkov, S. A., Bain, M., Farrell, P. J., West, M., Rowe, M., Allday, M. J.** (1997). Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J Virol*. **71**: 8552-8562.
- Razzouk, B. I., Srinivas, S., Sample, C. E., Singh, V., Sixbey, J. W.** (1996). Epstein-Barr virus DNA recombination and loss in sporadic Burkitt's lymphoma. *J Infect Dis*. **173**: 529-535.
- Rickinson, A. B. e Epstein, M. A.** (1978). Sensitivity of the transforming and replicative functions of Epstein-Barr virus to inhibition by phosphoacetate. *J Gen Virol*. **40**: 409-420.
- Rooney, C., Howe, J. G., Speck, S. H., Miller, G.** (1989). Influences of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the

- nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. *J Virol.* **63**: 1531-1539.
- Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, D. S., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E., Rickinson, A. B.** (1994). Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: A B-cell-specific response that is delayed relative to NF- κ B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol.* **68**: 5602-5612.
- Rowlands, D. C., Ito, M., Mangham, D. C., Reynolds, G., Herbst, H., Hallissey, M. T., et al.** (1993). Epstein-Barr virus and carcinomas: rare association of the virus with gastric carcinomas. *Br J Cancer.* **68**: 1014-1019.
- Russo, A., Bazan, V., Migliavacca, M., Tubiolo, C., Macaluso, M. et al.** (2001). DNA aneuploidy and high proliferative activity but not K-ras-2 mutations as independent predictors of clinical outcome in operable gastric carcinomas. *Cancer* **92**: 294-302.
- Sairenji, T., Ohnishi, E., Inouye, S., Kurata, T.** (1998). Induction of interleukin-10 on activation of Epstein-Barr virus in EBV-infected B-cell lines. *Viral Immun.* **11**: 221-231.
- Sakai, T., Taniguchi, Y., Tamura, K., Minoguchi, S., Fukuhara, T., Strobl, L. J., Zimmer-Strobl, U., Bornkamm, G. W., Honjo, T.** (1998). Functional replacement of the intracellular region of the Notch 1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol.* **72**: 6034-6039.
- Sample, J., Lancz, G., Nonoyama, M.** (1986). Mapping of genes in BamH1 fragment M of Epstein-Barr virus DNA that may determine the fate of viral infection. *J Virol.* **57**: 145-154.
- Sample, J., Tanaka, A., Lancz, G., Nonoyama, M.** (1984). Identification of EBV genes expressed during the early phase of virus replication and during lymphocyte immortalization. *Virology.* **139**: 1-10.
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A. B.** (1990). Epstein-Barr virus type 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol.* **64**: 4084-4092.
- Scholle, F., Bendt, K. M., Raab-Traub, N.** (2000). Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol.* **74**: 10681-10689.
- Sendler, A., Gilbertz, K-P., Becker, I., Mueller, J., Berger, U., Fink, U., van Beuningen, D., Siewert, J. R.** (2001). Proliferation kinetics and prognosis in gastric cancer after resection. *Eur J Can.* **37**: 1635-1641.

- Shaw, J. E.** (1985). The circular intracellular form of Epstein-Barr virus DNA is amplified by the virus associated DNA polymerase. *J Virol.* **53**: 1012-1015.
- Shinkura, R., Yamamoto, N., Koriyama, C., Shinmura, Y., Eizuru, Y., Tokunaga, M.** (2000). Epstein-Barr virus-specific antibodies in Epstein-Barr virus-positive and -negative gastric carcinoma cases in Japan. *J Med Virol.* **60**: 411-416.
- Silins, S. L. e Sculley, T. B.** (1994). Modulation of vimentin, the CD40 activation antigen and Burkitt's lymphoma antigen (CD77) by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-4. *Virology.* **202**: 16-24.
- Sixbey, J., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Hanes, R. A., Pagano, J. S.** (1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med.* **310**: 1225-1230.
- Sixbey, J. e Pagano, J. S.** (1985). Epstein-Barr virus transforming of human B lymphocytes despite inhibition of viral polymerase. *J Virol.* **53**: 229-301.
- Strauch, B., Siegel, N., Andrews, L., Miller, G.** (1987). Oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus by renal transplant recipients and other patients treated with immunosuppressive drugs. *Lancet.* **1**: 234-237.
- Sugai, T., Nakamura, S., Uesugi, N., Habano, W., Yoshida, T., Tazawa, H., Orii, S., Suto, T., Itoh, C.** (1999). Role of DNA aneuploidy, overexpression of p53 gene product, and cellular proliferation in the progression of gastric cancer. *Cyt.* **38**: 111-117.
- Sung, N. S., Kenny, S., Gutsch, D., Pagano, J. S.** (1991). EBNA-2 transactivates a lymphoid specific enhancer in the Bam HI C promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol.* **65**: 2164-2169.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., Kieff, E.** (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping and endocytosis. *Cell.* **50**: 203-213.
- Teramoto, N., Maeda, A., Kobayashi, K., Oka, T., Takahashi, K., et al.** (2000). Epstein-Barr virus infection to Epstein-Barr virus-negative nasopharyngeal carcinoma cell line TWO3 enhances its tumorigenicity. *Lab Invest.* **80**: 303-312.
- Thorley-Lawson, D. A. e Poodry, C. A.** (1982). Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies *in vivo*. *J Virol.* **43**: 730-736.
- Touitou, R., Cochet, C., Joab, I.** (1996). Transcriptional analysis of the Epstein-Barr virus interleukin-10 homologue during the lytic cycle. *J Gen Virol.* **77**: 1163-1168.

- Tsang, S-F., Wang, F., Izumi, K. M., Kieff, E.** (1991). Delineation of *cis*-acting element mediating EBNA-2 transactivation of latent infection membrane protein expression. *J Virol.* **65**: 6765-6771.
- Tunaci, M.** (2002). Carcinoma of stomach and duodenum: radiologic diagnosis and staging. *Eur J Radiol.* **42**: 181-192.
- Ulaeto, D., Wallace, L., Morgan, A., Morien, B., Rickison, A. B.** (1988). *In vitro* T cell responses to a candidate Epstein-Barr virus vaccine: human CD4+ T cell clones specific for the major envelope glycoprotein gp340. *Eur J Immunol.* **18**: 1689-1697.
- van Baarle, D., Hovenkamp, E., Dukers, N. H. T. M., et al.** (2000). High prevalence of Epstein-Barr virus type 2 among homosexual men is caused by sexual transmission. *J Infect Dis.* **181**: 2045–2049.
- van Grunsven, W. M. J., Spaan, J. M., Middeldort, J. M.** (1994). Location and diagnostic application of immunodominant domains of the BFRF3-encoded Epstein-Barr virus capsid protein. *J Infect Dis.* **170**: 13-19.
- Wang, F., Gregory, C. D., Rowe, M., Rickinson, A. B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T., Kieff, E.** (1987a). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**: 3452-3457.
- Wang, F., Gregory, C. D., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A. B., Kieff, E.** (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP-1 cooperatively induce CD23. *J Virol.* **64**: 2309-2318.
- Wang, F., Petti, L., Braun, D., Seung, S., Kieff, E.** (1987). A bicistronic Epstein-Barr virus mRNA encodes two nuclear proteins in latently infected, growth transformed lymphocytes. *J Virol.* **61**: 945-954.
- Yoshiyama, H., Imai, S., Shimizu, N., Takada, K.** (1997). Epstein-Barr virus infection in human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol.* **71**: 5688-5691.
- Young, L. S., Dawson, C. W., Eliopoulos, A. G.** (1999). Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways. *Biochem Soc Trans.* **27**: 807-812.
- Young, L. S. e Murray, P. G.** (2003). Epstein–Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene.* **22**: 5108-5121.
- zur Hausen, A., Brink, A. A. T.P., Craanen, M. E., Middeldorp, J. M., Meijer, C. J. L. M., van den Brule, A. J. C.** (2000). Unique transcription pattern of Epstein-

Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: Expression of the transforming *BARF1* gene. *Cancer Res.* **60**: 2745-2748.

8. ANEXOS

Tabela VII– Definição da classificação TNM e do tipo histológico, segundo o *American Joint Committee on Cancer* (2002).

<i>Tumor primário (T)</i>			
Tx	Tumor primário não classificável		
To	Tumor primário não é evidente		
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>		
T1	Tumor invade a lâmina própria ou a submucosa		
T2	Tumor invade a camada muscular ou a subserosa		
T3	Tumor invade a serosa, mas não estruturas adjacentes		
T4	Tumor invade estruturas adjacentes		
<i>Gânglios linfáticos regionais (N)</i>			
Nx	Gânglios linfáticos não são classificáveis		
N0	Gânglios linfáticos sem metástases		
N1	Metástases em 1 a 6 gânglios linfáticos regionais		
N2	Metástases em 7 a 15 gânglios linfáticos regionais		
N3	Metástases em mais de 15 gânglios linfáticos regionais		
<i>Metástases distantes (M)</i>			
Mx	Metástases distantes não são classificáveis		
M0	Ausência de metástases distantes		
M1	Evidência de metástases distantes		
Estádio	T	N	M
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T3	N2	M0
Estádio IIIB	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1
<i>Tipo histológico (G)</i>			
Gx	Não classificável		
G1	Muito diferenciado		
G2	Moderadamente diferenciado		
G3	Pouco diferenciado		
G4	Indiferenciado		